

**ANDREA CAROLINE RUTHES**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE HETEROPOLISSACARÍDEOS  
DO FUNGO LIQUENIZADO *Teloschistes flavicans* E DOS  
POLISSACARÍDEOS DO SEU MICOBIONTE, ISOLADO E  
CULTIVADO AXENICA E APOSSIMBIOTICAMENTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

**CURITIBA**

**2006**

Ao Prof. Marcello Iacomini em especial, pelo incentivo a pesquisa e ao crédito dado durante estes anos de convivência, permitindo que este trabalho se concretizasse.

Aos meus pais João e Elisabeth, ao meu irmão João Ricardo e ao Anderson, meu namorado, pelo apoio incondicional e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela dedicação, apoio e incentivo à pesquisa científica, sobretudo por ter acreditado em mim, por seus ensinamentos, lições, orientação e amizade.

Ao meu co-Orientador Prof. Dr. Guilherme L. Sassaki, pelos ensinamentos, sugestões e amizade.

Ao Prof. Philip A. J. Gorin, pelos ensinamentos científicos, e pelo exemplo de uma vida dedicada à pesquisa.

Aos meus pais João e Elisabeth, e ao meu irmão por estarem sempre presentes, embora morando em cidades diferentes, pelo apoio incondicional, incentivo, e por acreditarem na realização dos meus objetivos.

Ao Anderson, pelo amor, amizade, paciência, apoio, incentivo incondicional, e compreensão da minha ausência.

À Dra. Elaine R. Carbonero, pelos ensinamentos, ajuda, sugestões paciência, e acima de tudo pela amizade.

Aos Professores Dr. Guilherme L. Sassaki e Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela disponibilidade para a realização das análises de RMN.

À Rosane e a Andréia, pela disponibilidade para a realização das análises de GC-MS e HPSEC-MALLS.

Aos amigos de laboratório (247) Caroline Mellinger, Breno e Maria Luiza; em especial a Dirce pelo cultivo do micobionte, e manutenção das colônias, sem isso esse trabalho não teria sido realizado, mas em especial à amizade que se criou nesse período.

À Ana Helena, Fhernanda, Ricardo e Fernanda, pela amizade que

conseguimos cultivar, que consigamos manter a amizade sincera, embora nossos caminhos se afastem.

Ao pessoal dos laboratórios 247, E-1 e 252: Caroline, Breno, Dirce e Maria Luiza; Ana Helena, Elaine, Fhernanda, João, Lauro, Rodrigo Vassoler, Roger e Thales; Ricardo, Fernanda e Graciele, entre outros, e àqueles que já passaram por estes laboratórios: Lucimara, Juliana e Rodrigo Reis, pelos momentos de convivência e colaboração.

Aos colegas de laboratório “anexos” (sem citar nomes para não gerar briga, pelo esquecimento de algum nome).

Às coordenadoras do Curso de Pós-Graduação, Profa. Leda Satie Chubatsu e Profa. Maria Eugênia R. Duarte, pelo empenho e dedicação prestados e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

À Dona Marilza, pela presença alegre e prestativa.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

À CAPES, PRONEX- Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que de algum modo, me influenciaram positivamente durante este período, todo o meu reconhecimento.

Aos fungos liquenizados, esses organismos fascinantes, por sua existência.

À Deus, por permitir a realização de todos os meus objetivos.

"É melhor tentar, ao invés de sentar-se e nada fazer; É melhor falhar, mas não deixar a vida passar; Eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder; Prefiro ser feliz, embora louco, do que viver infeliz em são conformismo".

Martin Luther King

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS</b> .....	XIII
<b>RESUMO</b> .....	XV
<b>ABSTRACT</b> .....	XVI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 FUNGOS LIQUENIZADOS .....	1
1.1.1 Características Morfológicas .....	2
1.1.2 Distribuição do Fungos Liquenizados .....	4
1.1.3 Importância Econômica e Ecológica dos Fungos Liquenizados .....	5
1.2 CULTIVO DOS BIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS .....	6
1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FUNGOS LIQUENIZADOS .....	8
1.3.1 Substâncias Liquênicas .....	9
1.3.2 Carotenóides .....	9
1.3.3 Carboidratos de Baixa Massa Molar .....	10
1.3.4 Carboidratos de Alta Massa Molar .....	10
1.3.4.1 Heteropolissacarídeos de Fungos Liquenizados .....	13
1.4 POLISSACARÍDEOS DE MICOBIONTES .....	16
1.5 <i>Teloschistes flavicans</i> . .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 MATERIAL DE ESTUDO .....	19
3.2 ISOLAMENTO DO MICOBIONTE .....	20
3.3 MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS .....	21
3.4 MEIOS DE CULTURA .....	21
3.4.1 BBM – Bold's Basal Medium, confeccionado segundo AHMADJIAN (1993) ...	21
3.4.2 Meio TM – Meio para <i>Trebouxia</i> (AHMADJIAN, 1993) .....	22
3.4.3 Meio LBM – LILLY e BARNET (1951) .....	22

3.4.4 Meio Sabouraud 4 % - Sacarose – Agar (S4) (citado por CORDEIRO, 2000) .....	23
3.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS .....	23
3.5.1 Extração com Acetona .....	24
3.5.2 Extração Alcalina 1 .....	24
3.5.3 Extração Alcalina 2 .....	24
3.5.4 Extração Alcalina 3 .....	25
3.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	25
3.6.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo .....	25
3.6.2 Purificação dos Polissacarídeos Solúveis em Água por Precipitação com Solução de Fehling .....	26
3.6.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração e por Diálise em Membranas .....	26
3.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS .....	27
3.7.1 Hidrólise ácida total .....	27
3.7.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise .....	27
3.7.3 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar .....	28
3.7.4 Metilação das Frações Polissacarídicas .....	28
3.7.4.1 Hidrólise para formar os produtos parcialmente O-metilados .....	29
3.7.5 Hidrólise Ácida Parcial .....	29
3.7.6 Degradação de Smith .....	29
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	30
3.8.1 Cromatografia Líquido Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) .....	30
3.8.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	30
3.9 MÉTODOS COMPLEMENTARES .....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>32</b>
4.1 POLISSACARÍDEOS DE <i>Teloschistes flavicans</i> – LÍQUEN INTACTO .....	32
4.2 CULTIVO APOSSIMBIÓTICO DO MICOBIONTE .....	39
4.3 POLISSACARÍDEOS DO MICOBIONTE ISOLADO .....	40
4.3.1 Caracterização Estrutural das Frações SGK2-L e SGK2-S (sobrenadante de congelamento e degelo da extração KOH 2 %) .....	42



4.3.1.1 Fração SFK2-L (sobrenadante de Fehling do micobionte cultivado em meio líquido).....	45
4.3.1.2 Fração PFK2-L (precipitado de Fehling do micobionte cultivado em meio líquido).....	48
4.3.1.3 Fração PFK2-S (precipitado de Fehling do micobionte cultivado em meio sólido).....	50
4.3.2 Caracterização Estrutural da Fração K10 (extração KOH 10 %).....	54
4.3.2.1 Caracterização Estrutural da Fração PK10 (precipitado de congelamento e degelo da extração KOH 10 %) .....	55
4.3.3 Caracterização Estrutural da Fração K30 (extração KOH 30 %).....	57
4.4 EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS PELO MICOBIONTE.....	62
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	66
5.1 <i>Teloschistes flavicans</i> .....	66
5.2 MICOBIONTE ISOLADO.....	66
5.3 EXOPOLISSACARÍDEO .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Corte transversal de <i>Canomaculina pilosa</i> (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (cedida pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica - UFPR). Aumento de 1000 x	3
FIGURA 2	- Esquema ilustrativo das técnicas de isolamento do micobionte	8
FIGURA 3	- Principais estruturas observadas em galactomananas obtidas de líquens	15
FIGURA 4	- Fungo liquenizado <i>Teloschistes flavicans</i>	19
FIGURA 5	- Método utilizado para o isolamento do micobionte de <i>Teloschistes flavicans</i> , por meio de seus esporos (YOSHIMURA et al., 2002) (A); detalhe do apotécio em <i>T. flavicans</i>	20
FIGURA 6	- Esquema de obtenção das frações polissacarídicas, a partir do fungo liquenizado <i>Teloschistes flavicans</i>	33
FIGURA 7	- Perfis de eluição das frações K2 (A) e PFK2 (B), em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção - espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução 0,1 Mol/l de NaNO <sub>2</sub> (nitrito de sódio) e 0,2 g/l NaN <sub>3</sub> (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22µm)	34
FIGURA 8	- Espectros de RMN - <sup>13</sup> C das frações PFK2 (A), e do seu produto de hidrólise ácida parcial (TFA 0,1M, 8h) PFK2-8 (B), em Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub>	35
FIGURA 9	- Espectro de DEPT da fração PFK2, obtida do talo líquênico de <i>T. flavicans</i>	38
FIGURA 10	- Micélio (A); colônia após 6 meses de incubação (B); placa de petri com colônias do micobionte (C) e detalhe de uma colônia do micobionte isolado do fungo liquenizado <i>Teloschistes flavicans</i>	39
FIGURA 11	- Esquema de obtenção das frações polissacarídicas, a partir do micobionte cultivado apossimbioticamente	41
FIGURA 12	- Esquema de obtenção das frações polissacarídicas correspondentes à fração SK2 (sobrenadante de congelamento e degelo da extração KOH 2%), a partir do micobionte cultivado apossimbioticamente	43
FIGURA 13	- Espectro de RMN - <sup>13</sup> C das frações K2-S (extrato bruto da extração KOH 2 %, do micobionte cultivado em meio líquido) em Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> (70°C) (A), e SK2-S (sobrenadante de congelamento e degelo da fração K2-S) em D <sub>2</sub> O (50°C) (B)	44
FIGURA 14	- Perfil de eluição da fração SFK2-L em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução 0,1 Mol/l de NaNO <sub>2</sub> (nitrito de sódio) e 0,2 g/l NaN <sub>3</sub> (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22µm)	46
FIGURA 15	- Espectro de RMN - <sup>13</sup> C (A) e DEPT (B) da fração SFK2-L (obtida a partir do micobionte cultivado em meio líquido), em D <sub>2</sub> O (30°C)	46
FIGURA 16	- Perfis de eluição das frações PFK2-L (A), 16RPFK2-L (B) e DRPFK2-L (C), em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução 0,1 Mol/l de NaNO <sub>2</sub> (nitrito de sódio) e 0,2 g/l NaN <sub>3</sub> (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22µm)	49
FIGURA 17	- Espectro de RMN - <sup>13</sup> C da fração PFK2-L em D <sub>2</sub> O (50°C)	50
FIGURA 18	- Perfil de eluição da fração PFK2-S em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a índice de refração (IR) (HPSEC) (solubilizada em solução 0,1 Mol/l de NaNO <sub>2</sub> (nitrito de sódio) e 0,2 g/l NaN <sub>3</sub> (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22µm)	51
FIGURA 19	- Espectro de RMN - <sup>13</sup> C da fração PFK2-S em Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub> (70°C), uma α-D-glucana (1→4),(1→6), obtida do micobionte cultivado de <i>T. flavicans</i> (A), comparada com o espectro de RMN - <sup>13</sup> C da α-D-glucana	52

	obtida do talo líquênico de <i>T. flavicans</i> (REIS et al., 2002) (B).	
FIGURA 20	- Espectro de RMN - $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMQC (A), e COSY (B) da fração PFK2-S uma $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do micobionte cultivado de <i>T. flavicans</i> , em $\text{D}_2\text{O}$ (70°C)	53
FIGURA 21	- Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ das frações PK10-L, provavelmente uma $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida para o micobionte <i>T. flavicans</i> cultivado em meio líquido (A), e PK10-S, uma $\beta$ -D-glucana linear, (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, obtida para o micobionte <i>T. flavicans</i> cultivado em meio sólido (B) (solubilizadas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (50°C))	56
FIGURA 22	- Espectro de RMN - $^{13}\text{C}$ da fração PK30-S em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (70°C), uma $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do micobionte cultivado de <i>T. flavicans</i> (A), em comparação com o espectro de RMN - $^{13}\text{C}$ da $\beta$ -D-glucana obtida do talo líquênico de <i>T. flavicans</i> (REIS et al., 2002) (B)	59
FIGURA 23	- Espectro de RMN - $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMQC da fração PK30-S uma $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do micobionte cultivado de <i>T. flavicans</i> , em $\text{D}_2\text{O}$ (70°C)	60
FIGURA 24	- Espectro de DEPT da fração PK30-S, uma $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do micobionte cultivado de <i>T. flavicans</i> , em $\text{D}_2\text{O}$ (70°C)	60
FIGURA 25	- Esquema de obtenção das frações expolissacarídicas, a partir do meio líquido de cultivo aposimbótico, do micobionte <i>Teloschistes flavicans</i>	62
FIGURA 26	- Perfis de eluição das frações SFPE (A), DRSFPE (B), em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução de $\text{NaNO}_2$ 0,1 Mol/l (nitrito de sódio) e 0,2 g/l de $\text{NaN}_3$ (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22 $\mu\text{m}$ )	64
FIGURA 27	- Espectro de RMN - $^{13}\text{C}$ da fração DRSFPE, retida após ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa, em $\text{D}_2\text{O}$ (70°C), obtida a partir da precipitação etanólica do meio líquido de cultivo do micobionte <i>T. flavicans</i>	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Tipos de glucanas encontradas em fungos liquenizados	12
TABELA 2	- Tipos de heteropolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados	14
TABELA 3	- Componentes do Meio Lilly e Barnett (LBM)	23
TABELA 4	- Composição monossacarídica das frações derivadas do extrato K2, obtidas a partir do fungo liquenizado <i>Teloschistes flavicans</i>	33
TABELA 5	- Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana), obtida do talo liquênico de <i>T. Flavicans</i>	36
TABELA 6	- Composição monossacarídica das frações obtidas do micobionte isolado de <i>Teloschistes flavicans</i> , cultivado em meio líquido e sólido	42
TABELA 7	- Composição monossacarídica das frações sobrenadantes de Fehling (SFK2), obtidas a partir do micobionte isolado de <i>Teloschistes flavicans</i> , cultivado em meio líquido e sólido	45
TABELA 8	- Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (SFK2-L), obtida do micobionte isolado de <i>T. Flavicans</i>	47
TABELA 9	- Composição monossacarídica das frações precipitados de Fehling (PFK2), obtidas a partir do micobionte <i>Teloschistes flavicans</i> , cultivado em meio líquido e sólido	48
TABELA 10	- Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2-S; $\alpha$ -D-glucana linear (1→4), (1→6)) obtida a partir do micobionte de <i>Teloschistes flavicans</i> cultivado em meio sólido.	53
TABELA 11	- Composição monossacarídica das frações derivadas do extrato KOH 10 %, obtidas a partir do micobionte cultivado em meio líquido (L) e sólido (S)	55
TABELA 12	- Composição monossacarídica das frações K30-S, obtida a partir do micobionte cultivado em meio sólido	58
TABELA 13	- Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PK30-S; $\beta$ -D-glucana linear (1→3), (1→6)) obtida a partir do micobionte de <i>Teloschistes flavicans</i> cultivado em meio sólido	58
TABELA 14	- Composição monossacarídica do precipitado etanólico obtido a partir do meio líquido de cultivo do micobionte <i>Teloschistes flavicans</i>	63

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

~	- Aproximadamente
$^{13}\text{C}$	- Carbono treze
$^1\text{H}$	- Próton
3-O-MeGal	- 3-O-metil-galactopirranose
$\text{Ac}_2\text{O}$	- Anidrido acético
$\text{Ag}_2\text{CO}_3$	- Carbonato de prata
$\text{AgNO}_3$	- Nitrato de prata
$\text{BaCO}_3$	- Carbonato de bário
$\text{CH}_3\text{I}$	- Iodeto de metila
$\text{CHCl}_3$	- Clorofórmio
COSY	- <i>Correlation spectroscopy</i>
$\text{CuSO}_4$	- Sulfato de cobre
d.i.	- Diâmetro interno
$\text{D}_2\text{O}$	- Óxido de deutério
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
<i>f</i>	- Furanosídico
Gal	- Galactose
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	- Glucose
$\text{H}_2\text{O}$	- Água
$\text{H}_2\text{SO}_4$	- Ácido sulfúrico
HCl	- Ácido clorídrico
HMQC	- <i>Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy</i>
HOAc	- Ácido acético
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz (HPSEC-MALLS)
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
Hz	- Hertz
IR	- Índice de refração
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
kDa	- Kilodaltons
KOH	- Hidróxido de potássio
LS	- Espalhamento de luz
M	- Molar
Man	- Manose
$\text{Me}_2\text{SO}$	- Dimetilsulfóxido
$\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	- Dimetilsulfóxido deuterado
MeOH	- Metanol
$\text{NaB}^2\text{H}_4$	- Boroidreto de sódio deuterado
$\text{NaBH}_4$	- Boroidreto de sódio
$\text{NaIO}_4$	- Periodato de sódio
$\text{NaN}_3$	- Azida de sódio

NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sódio
NaOAc	- Acetato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
<i>p</i>	- Piranosídico
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	- <i>Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoracético
Xyl	- Xilose

## RESUMO

No presente trabalho, foram estudadas as estruturas de polissacarídeos obtidos do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, e de seu micobionte isolado e cultivado axenica e aposimbioticamente. A partir do talo liquênico, foram isoladas uma  $\alpha$ -D-glucana-(1 $\rightarrow$ 4),(1 $\rightarrow$ 6) e uma  $\beta$ -D-glucana-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6), anteriormente isoladas e caracterizadas para o talo liquênico, além de heteropolissacarídeos, dentre os quais foi caracterizada uma galactoglucomanana, com cadeia principal provavelmente formada por unidades de  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas. Sugerida, devido a presença do sinal em  $\delta$  100.3, de sinais invertidos no experimento de DEPT, e ao aumento do derivado 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Manp, referente às unidades de  $\alpha$ -D-Manp 6-O-substituídas, após hidrólise ácida parcial. O micobionte de *T. flavicans* foi isolado pela técnica de isolamento de esporos e cultivado em meio líquido (S4), e sólido (LBM). Passados 90 e 180 dias de cultivo, os micélios liofilizados foram submetidos a extrações sequenciais, para a obtenção das frações polissacarídicas. A partir do micobionte cultivado em meio líquido foram isolados e caracterizados heteropolissacarídeos, um correspondente ao sobrenadante de Fehling e outro ao precipitado de Fehling, ambos obtidos a partir da extração alcalina KOH 2 %. A fração sobrenadante de Fehling (SFK2-L), caracterizou-se como uma fração heteropolissacarídica, composta principalmente de Man (65 %), Glc (19 %), e Rha (10 %). Pelo espectro de RMN -<sup>13</sup>C e DEPT desta fração inferiu-se tratar-se de uma estrutura, com cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, devido à presença do sinal em  $\delta$  100.3, correspondente às unidades de Manp 6-O-substituídas, e a inversão de sinais no espectro de DEPT, na região de  $\delta$  68.7-67.6. Já para a fração precipitada de Fehling (PFK2-L), também foi isolada, mas parcialmente caracterizada uma galactoglucomanana, a qual apresenta três sinais principais na região de C-1, referentes a unidades de  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2) (102.7),  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3) (101.3) e  $\alpha$ -D-Manp 2,6-di-O-substituídas (99.0). Para o micobionte cultivado em meio sólido, foram isoladas e caracterizadas, uma  $\alpha$ -D-glucana linear, com ligações (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6), na relação molar de 1:1, denominada pululana, e uma  $\beta$ -D-glucana ramificada, com ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), na relação de 3:1. Ambas já haviam sido isoladas e caracterizadas para o talo liquênico, sugerindo assim, sua origem a partir do micobionte, sem a interferência do fotobionte (*Trebouxia*). Foi também isolada e caracterizada uma  $\beta$ -D-glucana linear, (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, tipo laminarana, descrita pela primeira vez para este fungo liquenizado, não sendo observada para o talo liquênico. Foi, ainda, avaliada a presença de exopolissacarídeos no meio líquido em que o micobionte foi cultivado, sendo isolado e caracterizado um heteropolissacarídeo, cuja estrutura necessita de análises adicionais, para que possa ter sua estrutura fina caracterizada.

## ABSTRACT

In the present study the structure of polysaccharides produced by the lichenized fungus *Teloschistes flavicans*, and of its isolated, axenic and aposymbiotically cultured mycobiont had been studied. From the lichen thallus an  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4),(1 $\rightarrow$ 6), and a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6) glucan were isolated. These structures had already been isolated, and characterized for this lichenized fungus. Beyond the heteropolysaccharides, a galactoglucomannan was characterized with a main chain probably formed by  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)-linked units. This was inferred by the presence of the signal at  $\delta$  100.3, inverted signals in the DEPT experiment, and to the increase of the 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Manp derivative, correspondent to the 6-O substituted  $\alpha$ -D-Manp units, after partial acid hydrolysis. The *T. flavicans* mycobiont was isolated by the spore isolation technique and cultivated in liquid (S4) and solid (LBM) culture media. Passed 90 and 180 days of cultivation the mycelia was submitted to sequential extractions for the attainment of polysaccharide fractions. From the mycobiont cultured in liquid medium two heteropolysaccharides had been isolated and characterized. A fraction correspondent to the Fehling supernatant and another one to the Fehling precipitate, both gotten from the alkaline KOH 2 % extraction. The Fehling supernatant fraction (SFK2-L), characterizes itself as an heteropolysaccharidic fraction, mainly composed of Man (65 %), Glc (19 %) and Rha (10 %). The NMR-<sup>13</sup>C and DEPT spectra of this fraction can itself inferred that deals a structure, whose main chain is formed by  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)-linked units, due to presence of the signal in  $\delta$  100.3 ppm, correspondent to the 6-O substituted  $\alpha$ -D-Manp units, and the inversion of C-6-linked DEPT signals. For the Fehling precipitate (PFK2-L) a structure was also isolated, but partially characterized as a galactoglucomannan, which presents three main signals at the C-1 region, referring the  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2) (102.7),  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3) (101.3) and 2,6-di-O-substituted  $\alpha$ -D-Manp units (99.0). For the mycobiont cultivated in solid medium were characterized a linear  $\alpha$ -D-glucan-(1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 6)-linked, 1:1 molar ratio, named pullulan, and a  $\beta$ -D-glucan-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-linked, in 3:1 molar ratio. Both structures had already been isolated and characterized for the lichen thallus, suggesting their origin from mycobiont, without the interference of the photobiont (*Trebouxia*). A linear  $\beta$ -D-glucan-(1 $\rightarrow$ 3), named laminaram, was also isolated and characterized for the first time to this lichenized fungus, not being observed for the lichen thallus. Still the presence of exopolysaccharides in liquid medium was evaluated, being isolated and characterized an heteropolysaccharide, whose structure needs additional analysis, so it can be fully characterized.



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 FUNGOS LIQUENIZADOS

Fungos liquenizados são o fenótipo simbiótico de fungos (micobiontes) nutricionalmente especializados, que adquirem carbono fixado a partir de uma população de pequenas células de algas verdes ou cianobactérias (fotobiontes).

Os fungos são microorganismos heterotróficos, dependentes de suprimento externo, portanto não auto-suficientes em carbono fixado. Caracteriza-se desta forma, a liquenização como uma estratégia nutricional comum e de muito sucesso, em que mais de 20% das espécies de fungos tornam-se liquenizadas (HAWKSWORTH et al., 1995).

Os fungos formadores de líquens são representantes de suas classes, diferindo do taxa não liquenizados por suas adaptações para a associação com uma população de pequenas células do fotobionte. O nome das espécies de líquens refere-se ao micobionte, não ao sistema simbiótico (GREUTER et al., 1988). Os fotobiontes liquênicos possuem nomes e filogenias próprios.

A maioria dos micobiontes caracteriza-se como biotrofo facultativo, ou seja, não dependentes fisiologicamente do meio de vida simbiótico, podendo ser cultivados axenicamente (sob condições estéreis), de forma apossimbiótica (separada do parceiro fotoautotrófico).

A relação entre o micobionte e o fotobionte é na maioria das vezes definida como uma simbiose mutualística, em que o desempenho ecológico é aumentado para ambos os parceiros, ou seja, micobionte e fotobionte no estado simbiótico, independente ao consumo de carbono fixado pelo organismo heterotrófico (SMITH e DOUGLAS, 1987). Entretanto, evidências, inclusive experimentais, apontam para o que se chama de um “parasitismo controlado” por parte do micobionte, que “cultiva” o fotobionte para obter alimento (AHMADJIAN, 1993). A principal conclusão que se tem é, porém, que existe um equilíbrio muito delicado nesta associação, e que qualquer distúrbio que altere a taxa de crescimento e/ ou mortalidade dos componentes envolvidos, pode levar à morte da associação. Além disso, a simbiose

liquênica é uma estratégia evolucionária bem sucedida, capaz de resultar em uma rica diversidade de espécies fúngicas (GRUBE e KROKEN, 2000).

A formação de uma associação liquênica é o resultado da adaptação mútua dos biontes (micobionte e fotobionte) para suprir suas necessidades combinadas (GALUN et al., 1984). Nesta associação, a alga contribui com a produção de açúcares por meio da fotossíntese e, no caso das cianofíceas pode ocorrer a produção de aminoácidos a partir de gás carbônico e nitrogênio atmosféricos.

A contribuição do micobionte é aparentemente secundária, mas este por sua vez, possui uma camada onde ficam alojadas as células do fotobionte, promovendo proteção contra o excesso de luz e ressecamento, podendo ainda facilitar a troca de gases (AHMADJIAN, 1993). Desta maneira, as células da camada algal encontram-se arranjadas de maneira a obter uma quantidade ótima de luz do sol para a realização da fotossíntese. As diferentes camadas e a forma como estão posicionadas no talo são resultados de diversas pressões adaptativas sofridas ao longo da evolução (AHMADJIAN, 1993).

#### 1.1.1 Características Morfológicas

O talo liquênico é constituído por algas microscópicas, semelhantes às espécies de vida livre, que em conjunto com as hifas fúngicas, desenvolvem-se simbioticamente (HALE, 1979; PURVIS, 2000).

O fotobionte e o micobionte crescem, portanto, em equilíbrio, formando um talo íntegro, no qual a alga e/ ou a cianobactéria (fotobionte) localizam-se extracelularmente à hifa fúngica (micobionte) (SMITH, 1992), de forma e estrutura interna constante e definida, sem semelhança morfológica alguma com a alga ou o fungo crescidos separadamente (HALE, 1979). O talo liquênico pode ser classificado em: folioso, fruticoso e crustoso, resultando em uma grande diversidade de espécies liquênicas.

O micobionte caracteriza-se como o componente estrutural dos fungos liquenizados, sendo o principal responsável pela morfologia do talo liquênico. A respeito das características morfológicas, as células do fotobionte são envolvidas por

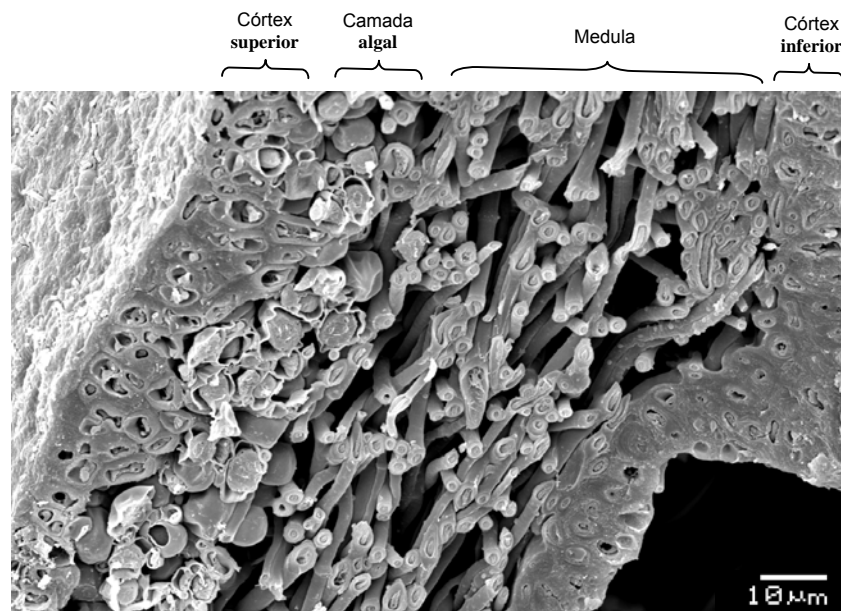
hifas, localizando-se próximo à superfície inferior e acima do córtex fúngico. Desta forma, os fungos liquenizados apresentam uma organização interna que mimetiza as folhas de plantas superiores, maximizando a absorção de luz (HONEGGER, 1993).

No talo liquênico observa-se um tecido resistente periférico, denominado córtex, o qual protege as células do fotobionte do ressecamento e do excesso de luz, e um tecido mais interno, chamado medula, o qual é frouxamente entrelaçado, facilitando as trocas gasosas (Figura 1).

O talo liquênico, especialmente quando folioso ou fruticoso, dos macrolíquens, imprevisivelmente ilustra a força inovadora do meio de vida simbiótico.

Em meio líquido ou sólido os micobiontes cultivados apossimbioticamente, invariavelmente formam colônias cartilaginosas, que se assemelham às colônias de crescimento lento dos *taxa* de fungos não liquenizados. Entretanto não carregam nenhuma similaridade com o fenótipo simbiótico.

FIGURA 1 - Corte transversal de *Canomaculina pilosa* (Stiz.) Elix & Hale em eletromicrografia de varredura (cedida pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro, Departamento de Botânica - UFPR). Aumento de 1000 x.



A parede celular dos biontes desempenha um papel central no crescimento e estabelecimento destes organismos, como indivíduos no ambiente (PEREYRA et al., 2003). Nos fungos de vida livre, a parede celular caracteriza-se como uma

estrutura complexa composta principalmente de polissacarídeos (80%). Em fungos liquenizados, estes polissacarídeos podem ser muito complexos, principalmente devido à co-evolução dos simbiossiontes e a sua longevidade (LUTZONI e PAGEL, 1997).

O micobionte apresenta-se como o componente mais abundante da associação simbiótica, mas a parede das células fúngicas permanece pouco estudada (GORIN et al., 1988). As paredes celulares de fungos de vida livre têm sido mais intensivamente estudadas, embora alguns aspectos, tais como, a estrutura fina dos polissacarídeos envolvidos, ainda continuem sob investigação (FONTAINE et al., 2000).

Estudos com fungos de vida livre ou fungos liquenizados (TEIXEIRA et al., 1995; WORANOVICZ et al., 1999), tendo como foco as frações solúveis da parede celular, mostraram que naqueles os polissacarídeos têm uma estrutura similar em espécies de gêneros bem delimitados. Sugere-se que estes compostos possam ser utilizados como ferramentas auxiliares em estudos quimiotaxonômicos, quando se considera o gênero destes organismos (AHRAZEM et al., 1997, 2000a, b; DOMENECH et al., 1999; LEAL et al., 2001). Estudos com fungos liquenizados, também indicam que estes polissacarídeos podem ser utilizados com caráter quimiotaxonômico (WORANOVICZ et al., 1999).

#### 1.1.2 Distribuição dos Fungos Liquenizados

São conhecidas de 13.500 a 17.000 espécies de fungos liquenizados (SIPMAN e APTROOT, 2001), dentre os quais 98% são ascomicetos (HONEGGER, 1993, 1995, 1996; GARGAS et al., 1995). Tal estimativa foi realizada a partir de catálogos completos, como o Zahlbruckner (1921-1931) e Lamb (1963) e do Index of Fungi (FARR et al., 2004).

Os fungos liquenizados podem ser encontrados desde os trópicos até as regiões polares. Alguns crescem sob a casca de árvores de regiões temperadas ou como epífitas nas folhas de árvores de florestas úmidas em regiões tropicais. Outras espécies são capazes de ocupar os ambientes mais inóspitos, crescendo sob lava resfriada e superfícies rochosas nuas, onde ajudam no processo de formação do

solo, e na areia de desertos, ajudando na estabilização da superfície. Outros tipos de fungos liquenizados crescem abundantemente em tundras, provendo assim, uma fonte alimentar de inverno para os animais em regiões árticas e sub-árticas. Ainda, outras espécies liquênicas podem crescer sob ou nas folhas de algumas culturas tropicais economicamente importantes, tais como, café, cacau e seringueira, onde são consideradas como parasitas.

O que torna viável a presença dos fungos liquenizados nos mais variados ambientes são as características biológicas inerentes a esses organismos, como por exemplo:

- Resistência a condições ambientais extremas (temperatura, luz e umidade);
- Nutrição independente do substrato, crescendo sobre rochas, troncos e terra;
- Crescimento muito lento;
- Sobrevivência relacionada a sua capacidade de dessecação rápido.

### 1.1.3 Importância Econômica e Ecológica dos Fungos Liquenizados

Os fungos liquenizados contribuem para o desgaste de rochas e a formação do solo, tornando possível a sucessão posterior de plantas. As espécies contendo cianobactérias são de grande importância na fixação de nitrogênio no solo. Alguns fungos liquenizados são particularmente sensíveis a compostos tóxicos, sendo utilizados como indicadores: de componentes tóxicos do ar poluído, particularmente do dióxido de enxofre; no mapeamento de metais pesados e outros poluentes freqüentemente encontrados ao redor de pólos industriais; e ainda utilizados como instrumentos para monitorar a contaminação por substâncias radioativas (HAWKSWORTH, 1984; PURVIS, 2000).

Devido as suas cores, que variam do branco ao negro, passando por tonalidades de vermelho, laranja, marrom, amarelo e verde, muitos fungos liquenizados são utilizados como fonte de corantes. Muitas espécies também têm sido utilizadas como medicamentos e bases para fixadores na indústria de perfumes

(RAVEN, 1996; PURVIS, 2000); outros fungos liquenizados são comestíveis.

## 1.2 CULTIVO DOS BIONTES DE FUNGOS LIQUENIZADOS

O cultivo de fungos liquenizados é extremamente importante, principalmente devido à sua dificuldade de isolamento, e crescimento de culturas puras de seus componentes. As lentas taxas de crescimento têm se apresentado como o maior obstáculo fisiológico dos estados axênicos (sob condições estéreis) (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1995), caracterizando uma grande dificuldade no trabalho experimental (AHMADJIAN, 1967).

Por serem resultado de uma associação entre um micobionte e um fotobionte, foram iniciadas tentativas de separar os componentes simbiotes dos fungos liquenizados com o objetivo de verificar se tais organismos poderiam ser considerados tecnicamente como individuais ou compostos.

Os estudos de isolamento de biontes de fungos liquenizados são em sua maioria direcionados para a investigação de ressíntese e desenvolvimento do talo em condições de laboratório. Em conjunto estão os estudos de culturas do fotobionte e micobionte isolados, os quais podem apresentar compostos específicos, de grande similaridade química com aqueles obtidos do Líquen intacto (CRITTENDEN et al., 1995). O isolamento de biontes apresenta papel central para o estabelecimento de sistemas experimentais para líquens, os quais são necessários para solucionar questões associadas à simbiose e quimiotaxonomia (STOCKER-WÖRGÖTTER, 1998; YOSHIMURA et al., 2002).

O interesse sobre organismos, como os fungos de vida livre e os fungos liquenizados, que se apresentam como fontes de novas moléculas farmacologicamente ativas tem aumentado gradativamente (PORTER e FOX, 1993). Muitos fungos liquenizados apresentam grande número de compostos secundários (VICENTE, 1991), muitos dos quais são exclusivos, não sendo encontrados em nenhum outro grupo de organismos (MATEOS et al., 1993). Grande número destes compostos apresenta ação: antimicrobiana (XAVIER FILHO et al., 1990; YAMAMOTO et al., 1993; ESIMONE e ADIKWU, 1999); antifúngica (YAMAMOTO et al., 1993); antiinflamatória (HIGUCHI et al., 1993; VIJAYAKUMAR et al., 2000); anti-

tumoral, antiviral e imunomoduladora (HIRABAYASHI et al., 1989; CARNEIRO-LEÃO et al., 1997; STUELP-CAMPELO et al., 2002), mostrando um potencial valor econômico. Muitas destas substâncias derivadas dos fungos liquenizados podem ser obtidas de culturas axênicas de micobiontes (HAMADA e MIYAGAWA, 1995; HAMADA et al., 1996).

A toxicidade de alguns compostos sugere uma função relacionada com a defesa química contra patógenos e animais que possam utilizar os fungos liquenizados como potencial fonte de alimento (ELIX et al., 1984).

Quando comparado com fungos de vida livre, a taxa de crescimento do micobionte é extremamente lenta, e mostra que o mesmo necessita de um complexo meio nutricional. Muito embora, em cultura, grande parte dos micobiontes tem a capacidade de biossintetizar compostos secundários encontrados no estado liquenizado nativo, a abundância de metabólitos encontrados pode ser diferente entre os estados nativo e em cultura, e, dependendo do material, ser mais abundante no estado liquenizado ou em cultura (CRITTENDEN et al. 1995).

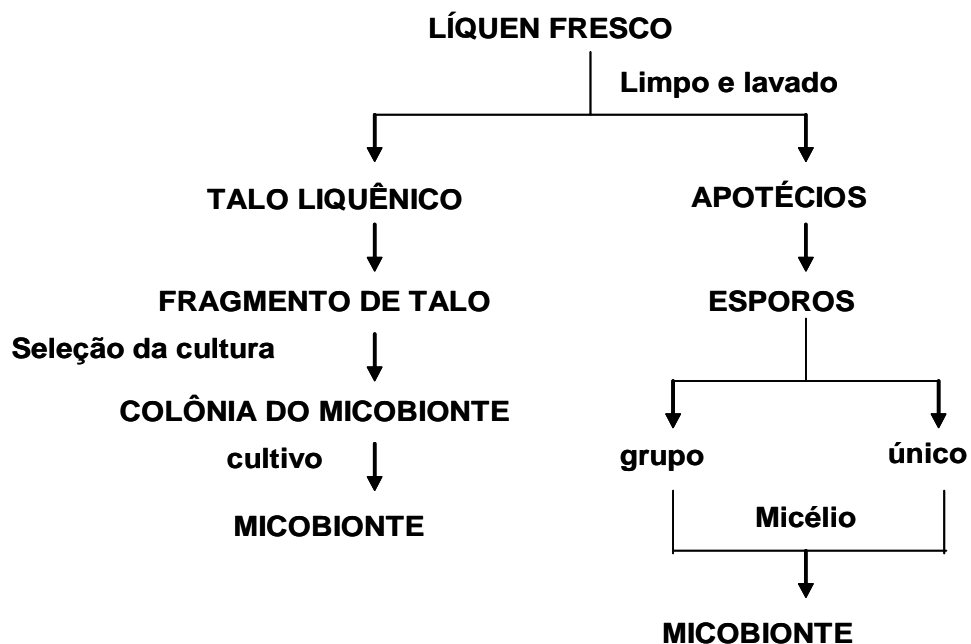
O isolamento de micobiontes, por meio do isolamento de esporos foi utilizado, influenciando assim, a liquenologia experimental. Estabelecida esta metodologia, buscou-se sucesso no isolamento a partir de um único esporo (AHMADJIAN e JACOBS, 1981; AHMADJIAN, 1993; CULBERSON et al., 1992; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1997), contribuindo assim para uma menor taxa de contaminação das colônias obtidas.

Para tanto foram desenvolvidos vários estudos na tentativa de determinar fatores que afetam a liberação e a germinação dos esporos. Entre estes estão: a época de coleta, temperatura, umidade, pH, fonte de carbono, nitrogênio e sais presentes no meio de cultivo, além dos ciclos de iluminação, salinidade, compostos secundários e poluentes atmosféricos (PYATT, 1969; OSTROFSKY e DENISON, 1980; AHMADJIAN, 1993; YAMAMOTO et al., 1993, 1998; YOSHIMURA et al., 2002; STOCKER-WÖRGÖTTER, 1998).

Outro método muito utilizado para o isolamento de micobiontes, denominado de fragmentação de talo, ou método de Yamamoto (YAMAMOTO et al., 1985). Este método vem sendo muito utilizado com o advento de novas técnicas de inoculação, e o uso do fluxo laminar, o que proporcionou uma grande diminuição da contaminação por outros organismos. A principal desvantagem deste método é a

impossibilidade de definir se a colônia isolada faz parte do líquen, ou se trata de um contaminante. Desta maneira, o uso de outros métodos para a identificação torna-se necessário. No entanto, a grande vantagem é o desenvolvimento rápido dos fragmentos de talo em relação às culturas derivadas de esporos (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001; YAMAMOTO et al., 1985, 1998).

FIGURA 2 – Esquema ilustrativo das técnicas de isolamento do micobionte



Com a separação, o isolamento e o cultivo dos simbioses, novas perspectivas foram abertas para o uso de fungos liquenizados na biotecnologia e na farmacologia, uma vez que estes representam uma importante fonte de compostos secundários e polissacarídeos (STOCKER-WÖRGÖTTER, 2001).

### 1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FUNGOS LIQUENIZADOS

A determinação da composição química, assim como das relações metabólicas decorrentes da simbiose, nos fungos liquenizados ainda é pouco estudada, apesar de possuírem uma utilização bem definida como matéria prima



para medicamentos e alimentação (CZECZUGA e SKULT, 1988).

Dentre os principais constituintes químicos encontrados nos fungos liquenizados estão as substâncias liquênicas, os carotenóides e os carboidratos de baixa e alta massa molar.

### 1.3.1 Substâncias Liquênicas

As substâncias liquênicas são produtos do metabolismo secundário do micobionte, sendo depositadas no córtex ou medula, em concentrações de 0,1 a 10%, em relação à massa do líquen seco, embora em alguns casos a concentração possa ser superior.

Cerca de 630 compostos, provenientes do metabolismo secundário dos fungos liquenizados são conhecidos. Dentre os quais estão os ácidos alifáticos (meta e para) – depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido púlvínico. Alguns destes compostos também são produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, mas a maior parte é considerada exclusiva dos fungos liquenizados (ELIX, 1996).

Tais substâncias vêm sendo utilizadas com propósitos taxonômicos. Para vários grupos (por ex: Parmeliaceae e Cladoniaceae) estes compostos são utilizados como critério na identificação das espécies, devido à sua capacidade de reação com substâncias químicas específicas, produzindo reações coloridas, e à sua grande especificidade de ocorrência nos fungos liquenizados (HONDA e VILEGAS, 1998).

### 1.3.2 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos acessórios capazes de absorver a luz em comprimentos de onda diferentes da clorofila, que comumente ocorrem nos fotobiontes dos fungos liquenizados. A ocorrência destes compostos nos talos liquênicos pode ser influenciada por fatores ambientais como clima, altitude, latitude e principalmente, a intensidade da luz ambiental (CZECZUGA e XAVIER-FILHO, 1987; CZECZUGA e SKULT, 1988). Estes compostos podem por sua vez, estar

envolvidos na fotoproteção do líquen contra luminosidade excessiva, e na termoproteção evitando a dissipação de energia (ADAM et al., 1993).

### 1.3.3 Carboidratos de Baixa Massa Molar

Poucos estudos têm sido realizados com relação à distribuição destes carboidratos de baixa massa molar nas diferentes espécies liquênicas (NISHIKAWA et al., 1973). A investigação mais abrangente foi realizada por LINDBERG e colaboradores (1953) em 60 espécies de fungos liquenizados.

Pertencem a esta classe de carboidratos os monossacarídeos redutores (pentoses, metilpentoses, hexoses e cetoses), polióis (moléculas lineares polihidroxiladas contendo de 3-7 átomos de carbono) e os oligossacarídeos (GORIN et al., 1993).

Podem estar relacionados na obtenção de energia (GORIN et al., 1993), caracterizando-se como compostos de reserva energética (LEWIS e SMITH, 1967). Dentre os polióis, o manitol e o arabinitol são os mais comuns em fungos liquenizados.

### 1.3.4 Carboidratos de Alta Massa Molar

Os fungos liquenizados, como organismos simbióticos de crescimento lento, contam com aproximadamente 13.500 espécies, capazes de se desenvolver em todo o mundo. Aproximadamente um terço destas espécies foi investigada quanto aos seus componentes de baixa massa molar, produzindo mais de 200 metabólitos secundários diferentes, muitos dos quais com atividade biológica (HUNECK e YOSHIMURA, 1996).

A descrição da presença de polissacarídeos em fungos liquenizados foi iniciada por Berzelius, em 1815 utilizando *Cetraria islandica* (SMITH, 1921). Deste fungo liquenizado foi extraída e isolada uma glucana insolúvel em água, atualmente

conhecida como liquenana (BERZELIUS<sup>1</sup>, citado por GORIN et al., 1993). Em estudos posteriores, verificou-se que este polissacarídeo era constituído por unidades de glucose, com rotação óptica de +18°, compatível com a configuração  $\beta$ . A estrutura foi determinada por análises de metilação e metaperiodato de sódio, e mostrou ser composta por ligações (1→3) e (1→4), na proporção de 3:7, e denominada de liquenana (MEYER e GÜRTLER, 1947).

Durante o processo de purificação da liquenana foi observada a presença de uma outra glucana, agora solúvel em água. Por meio de processos analíticos e quantitativos o polissacarídeo caracterizado foi uma  $\alpha$ -D-glucana linear composta por ligações (1→3), (1→4). Ao longo da cadeia da glucana foi observada uma estrutura repetitiva preponderante, com duas ligações (1→3) consecutivas interceptadas por uma ligação (1→4) isolada (43%); além de seqüências alternadas de ligações (1→3) e (1→4) (38%), e uma menor proporção de ligações (1→4) adjacentes (6%), sendo esta estrutura denominada isoliquenana (CHANDA et al., 1957).

A partir destes estudos preliminares com *Cetraria islandica*, em que foram isolados dois polissacarídeos, uma liquenana e uma isoliquenana, muitos outros trabalhos foram realizados com o objetivo de obter polissacarídeos de diferentes espécies de fungos liquenizados. Entretanto, não mais de 100 espécies de fungos liquenizados foram investigadas quanto aos seus polissacarídeos (OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001).

Comumente são produzidos três tipos estruturais principais,  $\alpha$ -glucanas,  $\beta$ -glucanas e galactomananas (GORIN et al., 1993), dentre os quais os polímeros mais conhecidos são as liquenanas, isoliquenanas, galactomananas e galactoglucomananas (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a; CARBONERO et al., 2001), que podem ser úteis em estudos quimiotaxonômicos.

Dentre os polissacarídeos caracterizados, as glucanas, são os homopolissacarídeos mais comumente encontrados, as estruturas de glucanas atualmente conhecidas são representadas na tabela 1. Pode-se observar que a maioria é linear, com diferentes tipos de ligações, pertencentes à série alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ). De acordo com o tipo de ligação e a proporção das ligações, as glucanas

---

<sup>1</sup> BERZELIUS, J. J. Versuche über die Mischung des Isländischen Mosses und Seine Anwendung als Nahrungsmittel. **J. Chem. Phys.**, v. 7, p. 317-353, 1815.

recebem denominações específicas (nigerana, isoliquenana, pustulana, entre outras).

Outros homopolissacarídeos encontrados são as xilanas, entretanto por serem encontradas em baixas concentrações, sugere-se que sua presença seja de responsabilidade do constituinte fotobionte (CORRADI da SILVA, 1992; GORIN et al., 1993; CORDEIRO, 2000).

TABELA 1 – Tipos de glucanas encontradas em fungos liquenizados

TIPOS DE GLUCANAS	DENOMINAÇÃO	PROPORÇÃO DAS LIGAÇÕES	CARACTERÍSTICAS
$\alpha$ -D-Glucana (1→3), (1→4)	Acroscifana	2:3	Possuem ligações (1→6) (~6%)
		2:5	Ramificação em O-3 (3%)
	Isoliquenana	3:1	Linear, distribuição irregular das ligações
		3,8:1	Ramificação em O-2 (5%)
		4:1	Linear
		6:1	Possuem ligações (1→6)
	Nigerana	1:1	Linear; pode ter ligação (1→2)
		1,2:1	Linear
$\alpha$ -D-Glucana (1→3)	Pseudo-nigerana	1:1	Linear
$\alpha$ -D-Glucana (1→4), (1→6)	Pululana	1:1	Linear
$\beta$ -D-Glucana (1→6)	Pustulana		Pode apresentar grupamentos O-acetil
$\beta$ -D-Glucana (1→3)	Laminarana		Linear
$\beta$ -D-Glucana (1→3), (1→4)	Liquenana	1:2	Linear
		1:3	Linear
		3:1	Linear
		3:7	Linear
$\beta$ -D-Glucana (1→3), (1→6)			Cadeia principal formada por unidades de $\beta$ -D-Glup (1→3), (1→6), ou $\beta$ -D-Glup (1→3) ligadas; ramificações em O-6 (~20%)

\* OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDOTTIR, 2001.

Polissacarídeos liquênicos que podem ser isolados em quantidades consideráveis, tais como as  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucanas, assim como as galactomananas são geralmente sugeridas como de origem do micobionte (GORIN et al., 1993; 1988). Esta afirmação é suportada por resultados de investigações no conteúdo

polissacarídico de muitos micobiontes, e fotobiontes isolados de fungos liquenizados e crescidos separadamente. TAKAHASHI et al. (1979), com o objetivo de verificar se os polissacarídeos eram produzidos pelo mico- ou fotobionte, ou ambos estudaram polissacarídeos solúveis em água, extraídos de mico- e fotobiontes de fungos liquenizados, cultivados em laboratório. Os simbiontes foram isolados dos fungos liquenizados: *Cladonia bellidiflora*, *C. graciliformis*, *C. rangifera*, *C. calycantha*, *Cladina mitis*, *Parmelia caperata* e *Ramalina crassa*. De acordo com os resultados de composição monossacarídica, rotação óptica específica, espectroscopia de infravermelho e solubilidade, os polissacarídeos dos micobiontes são muito similares, ou idênticos àqueles dos líquens intactos, enquanto que os do fotobionte apresentam composição diferente. Sugere-se, então, que a maior parte dos polissacarídeos solúveis dos líquens é produzida pelos micobiontes. No entanto, um polissacarídeo semelhante na composição monossacarídica ao heteropolissacarídeo do líquen de origem, *thamnotana*, foi descrito como um componente da parede celular do fotobionte (KÖNIG e PEVELÜNG, 1984).

A localização dos polissacarídeos presentes nos fungos liquenizados ainda não foi bem estabelecida, podendo tanto fazer parte da parede celular, ou como material de reserva do micobionte (glucanas); intracelulares, ou parte do material intercelular que circunda ambas as células, do fotobionte e do micobionte.

#### 1.3.4.1 Heteropolissacarídeos de Fungos Liquenizados

Além da intensiva pesquisa com as glucanas presentes nos fungos liquenizados, houve também um grande interesse em analisar os heteropolissacarídeos presentes nestes organismos. Em 1906 (ULANDER e TOLLENS, citado por GORIN et al., 1993), foi relatada também, uma fração heteropolissacarídica, obtida a partir de *Cetraria islandica*, contendo galactose, manose e glucose. Devido à utilização de processos de purificação inadequados e de métodos analíticos rudimentares não foi possível elucidar a estrutura química do heteropolissacarídeo. Apenas em 1984, com os trabalhos de GORIN, IACOMINI e colaboradores (GORIN e IACOMINI, 1984; 1985; IACOMINI et al., 1985), as estruturas químicas de algumas galactomananas isoladas de fungos liquenizados

foram elucidadas.

O heteropolímero de *Cetraria islandica* foi o primeiro heteropolissacarídeo estudado, e mostrou ser uma galactomanana constituída por uma cadeia principal composta por unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosose unidas por ligações (1→6) e com cadeias laterais de  $\alpha$ -D-galactopiranosose e de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas (1→2) e (1→4), respectivamente (GORIN e IACOMINI, 1984).

Para os heteropolissacarídeos, foram observados diferentes tipos de estruturas. Os dados referentes aos heteropolímeros descritos na literatura são apresentados de maneira sucinta na Tabela 2.

TABELA 2 - Tipos de heteropolissacarídeos encontrados em fungos liquenizados

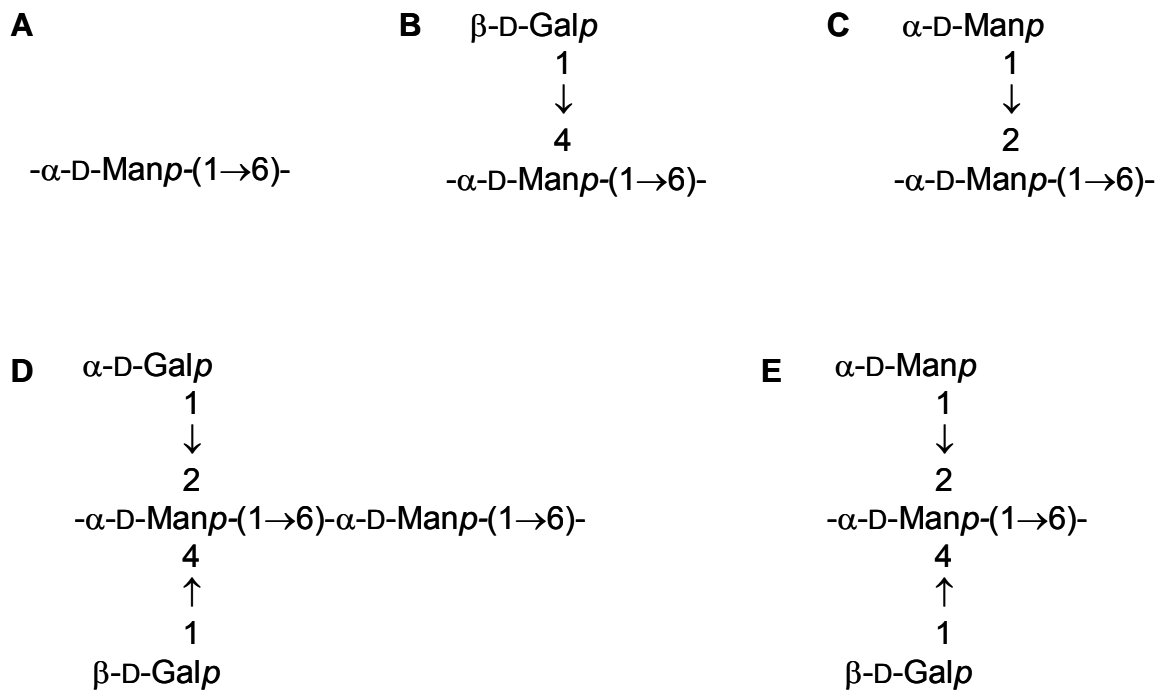
HETEROPOLISSACARÍDEOS	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	CADEIA PRINCIPAL	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS
Arabinogalactomanoglucana	Ara:Gal:Man:Glc 12:34:40:14	$\beta$ -D-Glc $p$ -(1→3)	Substituição em O-2 e O-6 por cadeias laterais altamente ramificadas
Galactomanana e/ou Galactoglucomanana	Man:Gal:Glc em proporções variáveis, sendo Man e Gal em maior proporção	$\alpha$ -D-Man $p$ -(1→6)	Diferentes padrões de substituição, principalmente em O-2, O-4 e/ou O-2,4, por unidades de $\alpha$ - ou $\beta$ -Gal $p$ , ou $\alpha$ -Man $p$ , ou Glc $p$ , e mais raramente por $\beta$ -Gal $f$
Galactomanoglucanas	variável	$\beta$ -D-Glc-(1→3)	Diferentes padrões de substituição, principalmente em O-2 e O-6, por cadeias laterais formadas por unidades de Man $p$ e Gal $p$ , tendo Gal $f$ como terminal não redutor
Glucomanana	Man:Glc (93:7)	$\alpha$ -D-Man $p$ -(1→6)	Substituída principalmente em O-2, por cadeias laterais de $\alpha$ -D-Man $p$ e menor proporção de $\alpha$ -D-Man $p$
Ramnogalactofurana (Thamnolana)	Gal:Rha:Glc:Xyl:Man 40:31:13:10:06	$\beta$ -D-Gal $f$ -(1→3)	Substituição em O-6
Xilomanana	Gal:Rha:Glc:Xyl:Man:Fuc (17:04:08:32:29:10)	$\alpha$ -D-Man $p$ -(1→3)	Não substituída (10%), 4-O- (10%) e 2,4-di-O-substituída (10%), por unidades de $\beta$ -D-Xyl $p$

\* OLAFSDOTTIR; INGÓLFSDDOTTIR, 2001.

As galactomananas e as galactoglucomananas são as mais comumente encontradas, apresentando uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -Man $p$ -(1→6) substituídas, principalmente em O-2, O-4 e/ou O-2,4, por unidades de  $\alpha$ - ou  $\beta$ -

Galp ou  $\alpha$ -Manp ou Glcp, e mais raramente, por  $\beta$ -Galf (Figura 3).

FIGURA 3 - Principais estruturas observadas em galactomananas obtidas de líquens.



Atualmente, estruturas de galactomananas, contendo cadeias laterais altamente complexas, foram obtidas de *Lasallia pustulata*, apresentando uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -Manp-(1→6), parcialmente substituídas por Galf e/ou por cadeias laterais de  $\alpha$ -Manp-(1→2), de diferentes tamanhos (PEREYRA et al., 2003). Galactomananas apresentando cadeias principais formadas por unidades de:  $\alpha$ -Manp-(1→2), substituídas em O-6 por unidades de  $\beta$ -Galf foram descritas para *Cladonia amaurocraea* (IACOMINI et al., 1985);  $\alpha$ -Manp-(1→3), não substituídas (10%), 4-O (10%) e 2,4-O- substituídas (10%) por unidades de  $\beta$ -Xylp, foram descritas para o líquen *Dictyonema glabratum* (como *Cora pavonia*, IACOMINI et al., 1987). Uma estrutura semelhante foi, também, obtida para o fungo liquenizado *Collema leptosporum* (PRADO-MALUCELLI, 1996; PRADO et al., 1999). Uma galactomanana apresentando uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -Manp-(1→4) foi descrita para o líquen *Roccella decipiens* (CARBONERO et al., 2005).

## 1.4 POLISSACARÍDEOS DE MICOBIONTES

Devido às dificuldades técnicas de isolamento do micobionte em colônias puras a partir do talo liquênico, e as lentas taxas de crescimento destes organismos em cultura (HONEGGER e BARTNICKI-GARCIA, 1991), muitos aspectos do metabolismo primário ainda não foram bem estabelecidos.

Em alguns estudos, autores afirmam que a parede celular de micobiontes é formada principalmente por liquenanas e isoliquenanas. No entanto, nenhum destes compostos foi identificado como componente da parede celular do micobionte (CORDEIRO, 2004).

Liquenanas e isoliquenanas têm sido isoladas a partir do talo liquênico, contendo produtos de parede celular, reserva, tanto de origem fotobionte, quanto micobionte. Polissacarídeos ramificados, contendo glucose, manose e galactose são extraídos alcalinamente de talos de vários fungos liquenizados (IACOMINI et al., 1985). Estudos relacionados à estrutura química de polissacarídeos de simbiontes liquênicos em culturas axênicas ainda são em pequeno número na literatura (CORDEIRO, 2004).

HONEGGER e BARTNICKI-GARCIA (1991) observaram que a parede celular de três micobiontes cultivados axenicamente (*Cladonia macrophylla*, *C. caespiticia* e *Physcia stellaris*) apresenta como composição monossacarídica principalmente glucose, seguido de manose e galactose, similar a de outros ascomicetos.

Estudando micobiontes cultivados apossimbioticamente, foi relatada também a presença de quitina em *Lasallia pustulata*, *Peltigera canina*, *P. praetextata*, *Hypogumnia physodes* (BOISSIERE, 1987; SCHALARMAN, 1987), *Xanthoria parietina*, *Tornobenia intricata* e *Sarcogyne* sp (GALUN et al., 1976).

## 1.5 *Teloschistes flavicans*

A espécie *Teloschistes flavicans*, pertencente ao gênero *Teloschistes*, foi descrita por Norman, 1852, embora tenha sido referenciada como *Lichen flavicans* em 1788 por SWARTZ. Ocorre em várias partes do mundo, com exceção das



regiões árticas e subárticas, sendo comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais da África e América do Sul (ALBORN, 1989), sua distribuição se dá predominantemente em áreas litorâneas, com alta pluviosidade, em geral restingas.

Segundo TEHLER (1996), o líquen *Teloschistes flavicans* pertence à subdivisão Dicariomicotina, Classe Ascomycetos, Subclasse Euascomycetos, Ordem Lecanorales, Sub-ordem Teloschistineae, Família Teloschistaceae.

*Teloschistes flavicans* é uma espécie preferencialmente cortícola, ou seja, desenvolve-se sobre o córtex de árvores, apresenta talo fruticoso, relativamente grande (2-10 cm de diâmetro), altamente ramificado, com ramos rígidos, e coloração variável, desde amarelo avermelhado até amarelo acinzentado. A presença de apotécio é rara, entretanto mais freqüente em regiões litorâneas tropicais, sendo seus esporos hialinos, biloculares e elipsoidais (ALBORN, 1989).

REIS (2001) isolou e caracterizou duas glucanas deste fungo liquenizado, uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações alternadas (1 $\rightarrow$ 4) (1 $\rightarrow$ 6), na proporção molar de 1:1 (pululana), descrita para fungos, liquenizados ou não pela primeira vez; uma  $\beta$ -D-glucana com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) na relação molar de 3:1, semelhante às anteriormente descritas por IACOMINI et al. (1987) e PRADO et al. (1999).

Para o fotobionte isolado a partir de *T. flavicans* foi isolada e caracterizada uma  $\beta$ -D-galactofuranana (1 $\rightarrow$ 5) (REIS, 2005).

Conhecendo os polissacarídeos desta espécie de fungo liquenizado. Buscou-se o isolamento de seus biontes. A partir do isolamento do foto- e do micobionte é interessante caracterizá-los estruturalmente para contribuir com o entendimento da simbiose, uma vez que estudos com relação à estrutura química de polissacarídeos de simbiontes liquênicos em culturas axênicas são pouco encontrados na literatura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral a análise estrutural dos heteropolissacarídeos obtidos do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, bem como dos polissacarídeos obtidos do seu micobionte isolado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o cumprimento deste objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- ✓ Extrair e purificar as frações heteropolissacarídicas do fungo liquenizado *T. flavicans*, bem como as frações polissacarídicas do micobionte isolado, cultivado apossimbioticamente;
- ✓ Caracterizar estruturalmente as frações obtidas, utilizando técnicas analíticas de RMN-<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, e GC-MS;
- ✓ Comparar as estruturas dos polissacarídeos obtidos para o líquen intacto e seu micobionte isolado, cultivado axenica e apossimbioticamente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL DE ESTUDO

O ascolíquen fruticoso, *Teloschistes flavicans* (SW.) Norman (Figura 4) foi coletado sobre troncos de árvores, em uma área de restinga, no município de Pontal do Paraná, localizado no Estado do Paraná, entre os meses de junho e julho do ano de 2000.

FIGURA 4 - Fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*

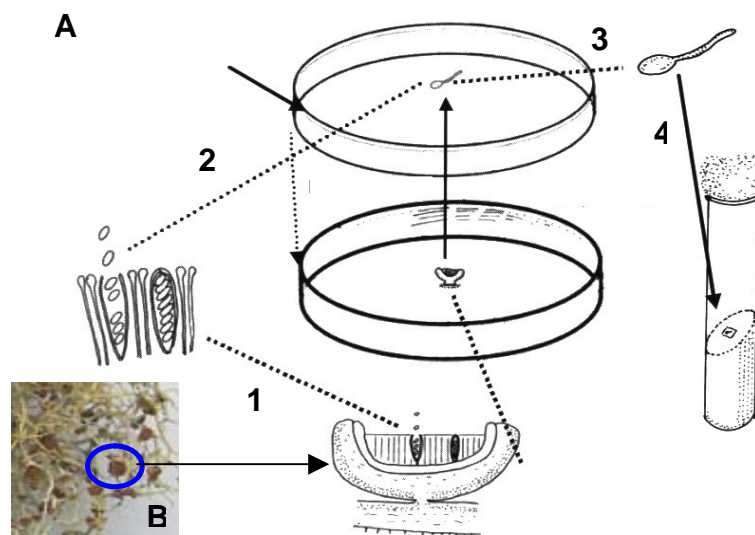


O fungo liquenizado foi identificado pela Profa. Dra. Sionara Eliasaro do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba - PR. Seu exemplar foi depositado no herbário da UFPR, registro No. 44617.

### 3.2 ISOLAMENTO DO MICOBIONTE

O ascolíqueno fruticoso *Teloschistes flavicans* teve seu micobionte isolado, utilizando a técnica de isolamento de esporos (YOSHIMURA et al., 2002), a partir dos apotécios, como demonstrado na Figura 5.

FIGURA 5 - Método utilizado para o isolamento do micobionte de *Teloschistes flavicans*, por meio de seus esporos (YOSHIMURA et al., 2002) (A); detalhe do apotécio em *T. flavicans*



Este método foi escolhido devido ao fato de que o fungo liquenizado em estudo apresenta apotécios, facilitando assim o isolamento dos esporos, e, ainda, devido à maior segurança que este método oferece no que diz respeito à identidade do micobionte isolado.

Os apotécios foram selecionados sob microscópio de dissecação e em seguida foram fixados em placas de petri, ficando voltados para o meio de cultivo, uma vez que o apotécio caracteriza-se como o corpo de frutificação dos fungos e líquens ascomicetos, onde ficam alojados os ascósporos, ou seja, os esporos responsáveis pela reprodução sexuada.

Os esporos foram liberados no meio de cultivo como representado na figura 5 (2), sendo então selecionados (Figura 5 (3)) e inoculados em tubos de

incubação, originando primeiramente uma massa micelial, que foi mantida em tubo de incubação até a formação da colônia (Figura 5 (4)).

Depois de desenvolvida a colônia (6 meses de incubação), esta foi repicada para placas de petri contendo meio sólido para a obtenção da massa de micobionte a ser estudada.

### 3.3 MANUTENÇÃO E CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS

As culturas foram mantidas em câmara de cultivo sob ciclo de 12 h a 24°C e 12 h a 27°C, em completa escuridão durante um período de 2 a 3 meses para promover exclusivamente o crescimento do micobionte. Periodicamente, o crescimento micelial e a presença de contaminação eram examinados sob microscópio de dissecação, e/ ou microscópio óptico. Passado este período, micélios livres de contaminação foram transferidos para novos meios nutrientes em placas de petri, e as culturas mantidas sob ciclo de 12 h a 27°C com iluminação e 12 h a 24°C no escuro.

Para a multiplicação das culturas e obtenção de biomassa, colônias com 2-3 meses foram removidas da superfície do Ágar, trituradas em grau com água destilada estéril e repicadas para novos meios. Em placas de petri para sólidos, e em frascos erlenmeyers de 2 l, contendo 250 ml de meio cada, para líquidos. Estes foram mantidos sob agitação constante de aproximadamente 200 rpm, e realizados sob fotoperíodo de 12 h.

### 3.4 MEIOS DE CULTURA

#### 3.4.1 BBM – Bold's Basal Medium, confeccionado segundo AHMADJIAN (1993).

Foram preparadas seis soluções estoque, cada uma em 400 ml de água, sendo:  $\text{NaNO}_3$  -10,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -3,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -7,0 g;  $\text{CaCl}_2$  -1,0 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -3,0 g;  $\text{NaCl}$  -1,0 g. Para cada meio foram adicionados 10 ml de cada solução

estoque, e completado o volume com água até 1000 ml (Parte I).

Quatro soluções de sais também foram preparadas, sendo: 1)  $\text{H}_3\text{BO}_3$  -1,42 g/l; 2)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -4,98 g/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  -1,57 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -8,82 g/l,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  -0,49 g/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  -1,44 g/l; 3)  $\text{MoO}_3$  -0,71g/l; 4) EDTA -50,0 g/l e KOH -31,0 g/l. Para cada meio foi adicionado 1 ml de cada uma das soluções de sais na Parte I.

Para uma concentração maior de  $\text{NaNO}_3$ , caracterizando o meio BBM 3N, multiplica-se por três a quantidade de  $\text{NaNO}_3$  colocada no meio e completaou-se o volume com água até 1000 ml.

#### 3.4.2 Meio TM – Meio para *Trebouxia* (AHMADJIAN, 1993)

O meio para *Trebouxia* também é denominado meio rico. Para sua confecção utilizaram-se:

- 10 g de peptona (1%);
- 30 g de glucose (3 %);

para 1000 ml de meio BBM, preparado como descrito anteriormente.

Para preparar o meio no estado sólido, foram adicionados 20 g de Ágar, correspondendo a 2%, de 1000 ml de meio, sendo este, BBM ou TM.

#### 3.4.3 Meio LBM – LILLY e BARNETT (1951)

Meio modificado por LAMLLEMONT ((1985) citado por CORDEIRO, 2000), contém fontes de carbono e nitrogênio, assim como sais e vitaminas. Confeccionada de acordo com a tabela a seguir (Tabela 3).

TABELA 3 - Componentes do Meio Lilly e Barnett (LBM)

ELEMENTO	FONTE	QUANTIDADE
C	D-glucose	40 g
N	L-asparagina	2 g
MgS	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KP	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Fe	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,2mg
Zn	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
Mn	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 mg
Tiamina	-	100 µg
Biotina	-	5 µg

\*Quando sólido, acrescentar 20 g de Agar.

Este meio é completado para 1000 ml de água destilada.

#### 3.4.4 Meio Sabouraud 4 % - Sacarose – Ágar (S4) (citado por CORDEIRO, 2000)

Meio confeccionado pela adição de: 10 g de peptona de carne, 10 g de peptona de caseína, 20 g de sacarose e 20 g de Agar, completando o volume para 1000 ml de água destilada.

### 3.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

O fungo liquenizado *T. flavicans*, bem como os micobiontes cultivados nos meios líquido e sólido foram submetidos a extrações seqüenciais. Primeiramente com acetona, para extração de seus componentes lipídicos, carboidratos de baixa massa molar e glicoconjugados; em seguida com KOH 2, 10 e 30% para extração das frações polissacarídicas.

### 3.5.1 Extração com Acetona

Os materiais foram inicialmente pesados: 34,8 g para o fungo liquenizado *T. flavicans*, 8,71 g para o micobionte cultivado em meio sólido e 2,73 g para o micobionte cultivado em meio líquido. Em seguida, separadamente foram submetidos à deslipidificação utilizando acetona (300 ml) sob refluxo em banho-maria a 60°C, durante 2 h. Este processo foi repetido por três vezes para cada material.

Após cada extração, os extratos foram filtrados ainda quentes e evaporados até secar em temperatura ambiente, para que os rendimentos pudessem ser calculados.

Os materiais residuais foram, então, submetidos ao próximo processo extrativo.

### 3.5.2 Extração Alcalina 1

Os materiais residuais do processo de deslipidificação foram tratados com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 2% na presença de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) por 3 h, sob refluxo em banho fervente. O processo repetido por três vezes. Os extratos foram filtrados ainda quentes. Em seguida foram neutralizados com ácido acético, dialisados e liofilizados. O processo foi realizado tanto para o líquen intacto, quanto para os micobiontes cultivados em meio sólido e em meio líquido. Os extratos obtidos foram denominados de K2TF, K2S e K2L, respectivamente.

### 3.5.3 Extração Alcalina 2

Os resíduos provenientes da primeira extração alcalina foram submetidos a três extrações com hidróxido de potássio a 10%, por 2 h, em banho fervente, sob refluxo. Os extratos foram filtrados, neutralizados, dialisados e liofilizados, originando as frações K10TF, K10S e K10L, para o líquen intacto, e micobiontes cultivados em



meio sólido e líquido, respectivamente.

#### 3.5.4 Extração Alcalina 3

Por fim, os resíduos das extrações com hidróxido de potássio a 10% foram submetidos a três extrações com hidróxido de potássio a 30%, por 1 h, em banho fervente, sob refluxo. Da mesma maneira, os extratos foram filtrados, neutralizados, dialisados e liofilizados, dando origem às frações K30S e K30L, para o micobionte cultivado em meio sólido e líquido, respectivamente.

Para o fungo liquenizado não foi realizada esta etapa de extração.

### 3.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As frações correspondentes aos extratos alcalinos foram submetidas a passos seqüenciais de purificação, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

#### 3.6.1 Separação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

Os extratos alcalinos foram primeiramente submetidos ao processo de purificação de congelamento e degelo descrito por GORIN e IACOMINI (1984). Para tanto, as amostras após diálise foram congeladas e em seguida submetidas ao degelo à temperatura ambiente. As frações insolúveis em água fria foram separadas dos demais componentes solúveis por centrifugação (6451 x g rpm, 15 min.).

Este procedimento foi repetido por diversas vezes em todas as frações, até que os sobrenadantes não formassem mais precipitados. Por outro lado, os precipitados também foram novamente submetidos ao processo de congelamento e degelo por mais três vezes, com a finalidade de retirar completamente possíveis compostos solúveis contaminantes da amostra.

Os materiais foram, então, congelados e liofilizados, originando as frações sobrenadantes de congelamento e degelo (S), e as frações referentes aos

precipitados de congelamento e degelo (P).

### 3.6.2 Separação dos Polissacarídeos Solúveis em Água por Precipitação com Solução de Fehling

Os sobrenadantes ou precipitados do processo de congelamento e degelo foram submetidos ao tratamento com solução de Fehling (JONES e STOODLEY 1965). Esta solução consiste da combinação de duas soluções (A e B). A solução A é composta por tartarato de potássio e KOH (173 g + 125 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml, respectivamente), enquanto que a solução B consiste de CuSO<sub>4</sub> 5.H<sub>2</sub>O (55,7 g / H<sub>2</sub>O q.s.p 500 ml).

Às frações polissacarídicas solúveis em água foram adicionadas às soluções de Fehling, sendo a mistura vigorosamente agitada e deixada em repouso à 4°C por 12 h.

Os precipitados e os sobrenadantes foram então, separados por centrifugação (6451 x g, 15 min, 25°C), neutralizados com ácido acético e dialisados contra água corrente. Após diálise ambos foram deionizados por resina catiônica fortemente ácida e novamente dialisados.

Posteriormente os materiais foram, então, concentrados sob pressão reduzidas, congelados e liofilizados, para terem seus rendimentos calculados.

### 3.6.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração e por Diálise em Membranas

As frações que se mostraram heterogêneas após precipitação por solução de Fehling foram, então, submetidas a ultrafiltração em membranas de celulose regenerada ou polietersulfona, com limites de exclusão de 10 kDa e/ou 300 kDa (Millipore). As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração (modelo 16249, Sartorius) acoplado a um cilindro de ar comprimido (CARBONERO, 2005).

O processo de purificação destes polissacarídeos também foi realizado por diálise fechada, contra água destilada, através de membrana com limite de exclusão de 16 kDa. Durante a diálise, o material foi mantido sob agitação magnética, e o processo foi interrompido quando a água de diálise apresentou reação negativa para

a presença de carboidratos, por meio do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

### 3.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

#### 3.7.1 Hidrolise Ácida Total

As amostras (5 mg) foram tratadas com 1 ml de solução aquosa de TFA 1M (Ácido tri-fluoracético), durante 8 h à 100°C. Posteriormente, o TFA remanescente foi removido por evaporação à secua das soluções hidrolisadas. As amostras foram, então, levadas à redução e acetilação.

#### 3.7.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise Ácida Total

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio, em temperatura ambiente por 12 h, em pH 10,0 (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Após este período, os íons sódicos foram retirados por tratamento com resina catiônica. A solução foi filtrada em algodão e levada à secua em evaporador rotatório. O ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de trimetila, por meio de co-evaporação com metanol.

Os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético:piridina (1:1, v/v), *overnight*, à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). A reação foi interrompida por adição de gelo e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual, ainda presente na fração clorofórmica, foi removida por complexação com sulfato de cobre 2%. Após completa remoção da piridina, o clorofórmio foi evaporado e os acetatos de alditol analisados por GC-MS (Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa).

### 3.7.3 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio  $0,1\text{M.l}^{-1}$  contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ )  $0,2\text{ g.l}^{-1}$ , para uma concentração final de  $2\text{ mg/ml}$ , e em seguida foram filtradas em membranas de acetato de celulose com tamanho porosidade equivalente a  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ . Os filtrados foram, então, aplicados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters, sendo utilizadas 4 colunas de gel permeação Waters em série, com limites de exclusão de  $7.10^6$ ,  $4.10^5$ ,  $8.10^4$  e  $8.10^3$ . Equipado com um detector de índice de refração diferencial Waters, modelo 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) Wyatt Technology, modelo Dawn DSP com 18 canais acoplados em série. O eluente utilizado foi a solução de nitrito de sódio  $0,1\text{ M.l}^{-1}$ , contendo azida de sódio ( $0,2\text{ g/l}$ ), com fluxo de  $0,6\text{ ml/min}$ , pressão de  $920\text{ p.s.i.}$  a  $25^\circ\text{C}$ , e monitorados através de bomba peristáltica Waters 515.

Os valores da massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) foram obtidos utilizando o programa Astra (Wyatt Technology).

### 3.7.4 Metilação das Frações Polissacarídicas

As frações polissacarídicas puras ( $2\text{-}5\text{ mg}$ ) foram metiladas pelo método de CIUCANU e KEREK (1984) e HAWORTH (1915).

No primeiro método, os polissacarídeos foram solubilizados ( $1\%$ , p/v) em dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ). Após solubilização, foi adicionado hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) seco e triturado ( $4:1\text{ NaOH:carboidrato}$ ). A solução foi mantida sob agitação e, então, foi adicionado iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), na proporção  $\text{CH}_3\text{I/NaOH/carboidrato}$  recomendada ( $1:200:50$ ). Após 24 horas, as amostras foram neutralizadas com  $\text{HOAc}$ , dialisadas exaustivamente contra água corrente, liofilizadas, este processo foi repetido novamente. Terminada a metilação, foi realizada a extração dos produtos per-O-metilados com  $\text{CHCl}_3$ , que após secura foram submetidos à hidrólise (item 3.7.4.1).

No segundo método,  $10\text{-}20\text{ mg}$  de material foram solubilizados em água destilada, tratados com boroidreto de sódio e dialisados contra água corrente. Em

seguida, foram liofilizados e solubilizados em 3 ml de uma solução de NaOH 40% (p/v). Ao material mantido sob agitação magnética constante foram adicionados 0,5 ml de dimetilsulfato (DMS), por cinco vezes. O material foi deixado sob agitação *overnight*, sendo adicionados 3 ml da solução de NaOH 40%, e consecutivamente 0,5 ml de DMS (5x). O material foi, então, neutralizado com ácido acético, dialisado e liofilizado. Uma alíquota deste (2 mg) foi submetida à hidrólise, como descrito no item 3.7.4.1.

#### 3.7.4.1 Hidrólise para formar os produtos parcialmente O-metilados

A hidrólise ácida total dos polissacarídeos metilados foi realizada com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 50% (v/v; 0,5 ml) por 1 hora a 0°C. Seguida de diluição até 5,5% (v/v; adição de 4,0 ml de água destilada), sendo então, mantida a 100°C por um período de 14-18 horas. O material hidrolisado em seguida foi neutralizado com  $\text{BaCO}_3$  (SAEMAN et al., 1954).

#### 3.7.5 Hidrólise Ácida Parcial

A fração heteropolissacarídica (galactomanana: fração PFK2, 600 mg) de *T. flavicans* foi parcialmente hidrolisada com TFA pH 2,0 (2 ml) a 100°C, e o material foi posteriormente evaporado. O polissacarídeo restante foi precipitado com excesso de etanol, e o precipitado resultante foi dialisado em água corrente, em membrana com limite de exclusão de 2 kDa e liofilizado. Uma amostra (2 mg) foi hidrolisada e seus monossacarídeos analisados quanto aos seus derivados acetatos de alditol, por GC-MS. O restante foi examinado por RMN- $^{13}\text{C}$  e metilação.

#### 3.7.6 Degradação de Smith

Uma alíquota do polissacarídeo foi dissolvida em água e acrescida de periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ), atingindo a concentração final de 0,05 M. A solução foi, então, mantida por 72 h sob ausência de luz. O processo de oxidação foi

interrompido pela adição de etileno glicol, seguida de diálise exaustiva contra água corrente. A solução foi reduzida com  $\text{NaBH}_4$  (pH 9,0-10,0) por 24 horas (ABDEL-AKHER et al., 1952; DYER, 1956; HAY; LEWIS; SMITH, 1965). Em seguida, a amostra foi tratada com resina catiônica até pH 7,0, dialisada por 48 h e submetida à hidrólise ácida parcial (TFA pH 2,0, por 30 minutos, sob refluxo em banho com água fervente). Posteriormente a solução foi neutralizada e precipitada com EtOH (5:1, v/v), sendo o precipitado dialisado, em água corrente, em membrana com limite de exclusão de 2kDa.

### 3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.8.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás Varian, modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca Finnigan Mat, modelo ITD-800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida DB-225. A programação de temperatura utilizada foi a seguinte: partindo de 50°C (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de 40°C /min, até 215°C (acetatos de alditol parcialmente O-metilados), ou 220°C (acetatos de alditol), sendo mantida constante até o final da análise. O gás de arraste utilizado foi hélio ultra puro, a um fluxo de 1,0 ml.min<sup>-1</sup>.

#### 3.8.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros mono [RMN-<sup>13</sup>C, -<sup>1</sup>H e DEPT (*Distortionless enhancement by polarization transfer*)] bidimensionais [HMQC (*Heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*)] COSY (*Correlation spectroscopy*), foram obtidos pelo uso de espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400.

As análises foram realizadas a 30°C, 50°C ou 70°C, com as amostras

sendo solubilizadas em D<sub>2</sub>O (óxido de deutério) ou Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>, dependendo da sua solubilidade. Os deslocamentos químicos das amostras solúveis em D<sub>2</sub>O foram expressos em  $\delta$  relativos aos sinais de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H da acetona em  $\delta$  30,20 e 2,22, respectivamente, e aos sinais do Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> em  $\delta$  39,70 (<sup>13</sup>C) e 2,40 (<sup>1</sup>H), para as amostras solúveis no mesmo.

### 3.9 MÉTODOS COMPLEMENTARES

As pesagens de precisão foram realizadas em balança analítica Mettler, modelo AB 204. Outras pesagens foram realizadas em balança Acculab, modelo V-1200.

As frações polissacarídicas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório Fisatom, modelo 802, acoplado a banho-maria, em temperaturas próximas ou inferiores a 40°C.

As liofilizações foram realizadas em aparelho Edwards.

As medidas de pH foram determinadas em potenciômetro Micronal, modelo B222, em temperatura ambiente, ou com fitas reativas Merck.

As centrifugações foram realizadas em centrífuga Beckman, modelo GS-15 (6451 x g), Hitachi Himac CR 21E, e na microcentrifuga eppendorf 5417c (1613 x g).

Foi utilizado etanol com grau de pureza comercial para a precipitação dos polissacarídeos, sendo os demais solventes e reagentes utilizados com grau de pureza PA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi estudado o fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, bem como seu micobionte isolado e cultivado axenica e aposimbioticamente, foram analisados quanto aos seus componentes polissacarídicos.

Conforme descrito anteriormente na seção Material e Métodos, cada um destes materiais sofreu o processo de extração e purificação exposto no esquema da figura 5. Em geral, os materiais estudados foram, primeiramente, deslipidificados e submetidos aos procedimentos de extrações e purificações de carboidratos de alta massa molar.

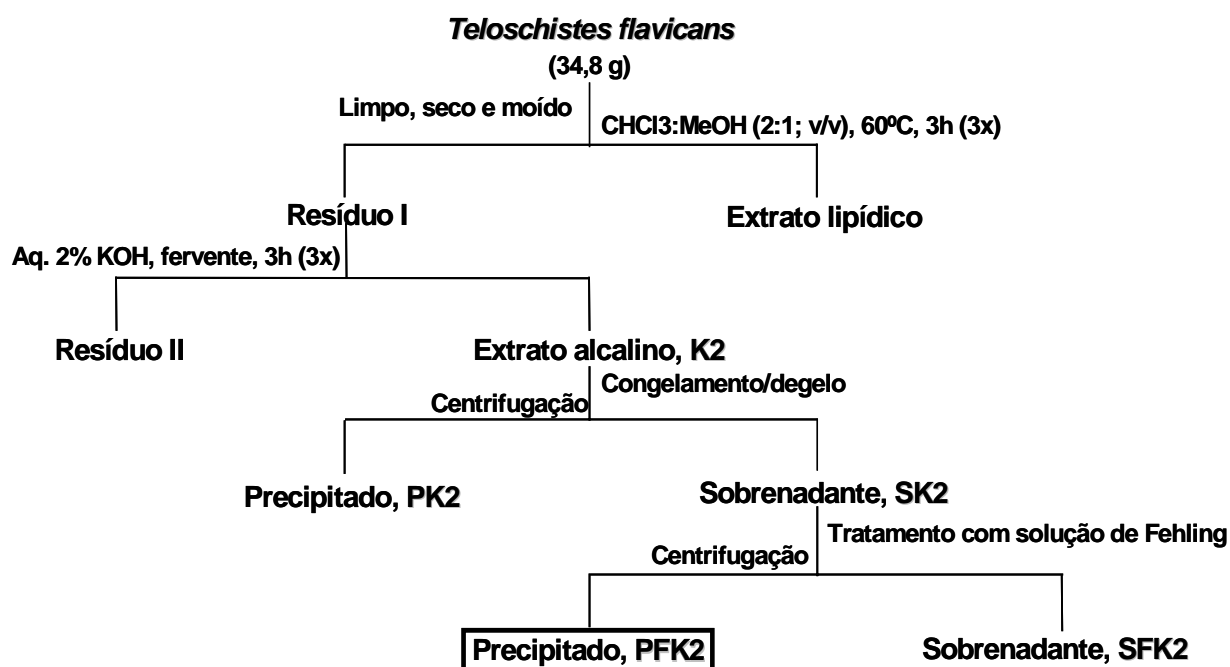
### 4.1 POLISSACARÍDEOS DE *Teloschistes flavicans* – LÍQUEN INTACTO

Com a intenção de remover lipídeos, pigmentos e material hidrofóbico, o talo liquênico (34,8 g) foi extraído com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH. O material deslipidificado foi submetido a sucessivas extrações alcalinas.

Primeiramente foi realizada uma extração alcalina com KOH 2%, a 100°C (Figura 5), e após neutralização (HOAc), os polissacarídeos extraídos foram recuperados por precipitação etanólica, originando a fração denominada K2. Esta fração mostrou ser composta por Man, Gal, Glc e Rha, na relação molar de 47:11:34:8 (Tabela 4). Em seguida o extrato K2 heterogêneo (Figura 7) foi submetido a um processo de congelamento e degelo, originando uma fração insolúvel (PK2), e outra solúvel em água fria (SK2) (Figura 6).



FIGURA 6 - Esquema de obtenção das frações polissacarídicas, a partir do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*



A fração SK2 foi tratada com solução de Fehling, originando um precipitado (PFK2) e um sobrenadante (SFK2) de Fehling. A fração PFK2 tem como composição monossacarídica, Man (71%), Gal (10%), Glc (14%) e Rha (5%), e após de hidrólise ácida parcial (PFK2-8), apresentou Man (76%), Glc (17%), além de Rha (5%) e Gal (2%) (Tabela 4).

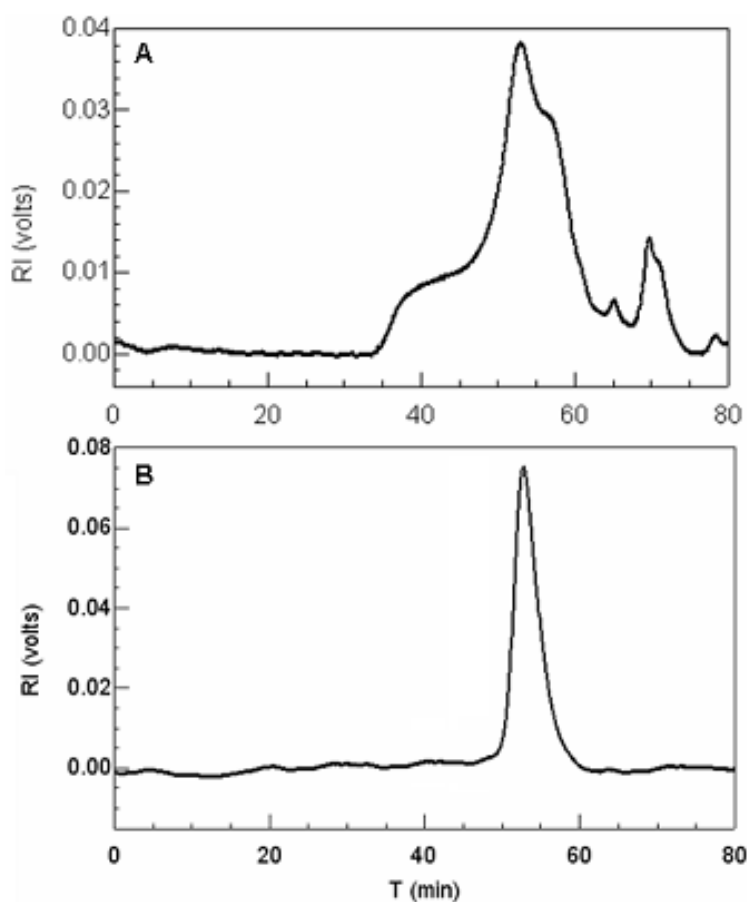
TABELA 4 - Composição monossacarídica do extrato K2 e das frações dele derivadas, obtidas a partir do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA* (g %)			
	Rha	Man	Gal	Glc
K2	8	47	11	34
PFK2	5	71	10	14
PFK2-8	5	76	2	17

\* Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

Quando analisada por HPSEC-MALLS, a fração PFK2 apresentou um perfil homogêneo (Figura 7B), sendo sua massa molar  $M_w = 740.000$  g/mol ( $dn/dc = 0,156$ ).

FIGURA 7 - Perfis de eluição das frações K2 (A) e PFK2 (B), em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução 0,1 Mol/l de  $\text{NaNO}_2$  (nitrito de sódio) e 0,2 g/l  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de  $0,22\mu\text{m}$ )

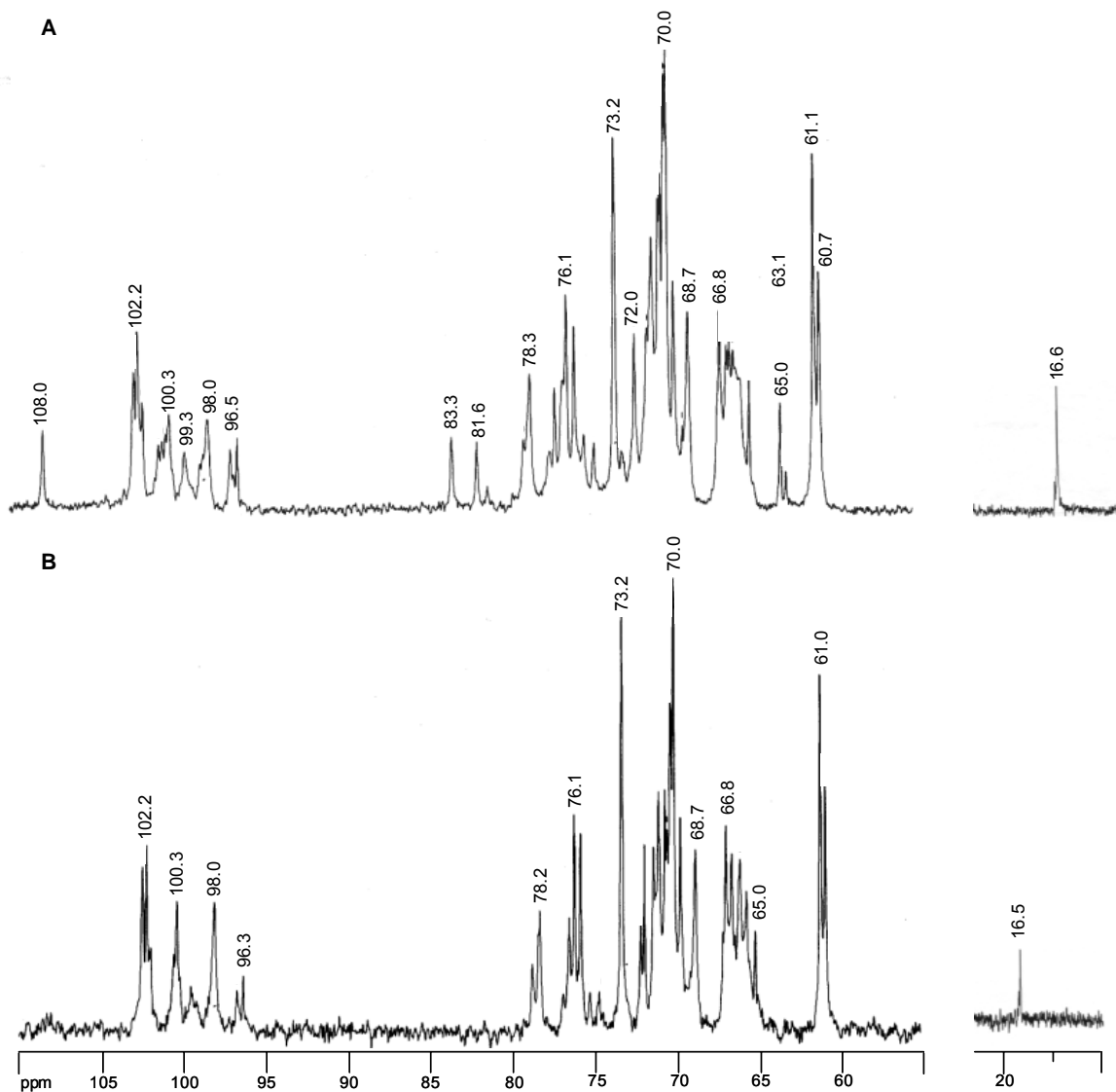


Em geral, foi demonstrado que os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de heteropolissacarídeos são característicos de cada espécie de líquen (WORANOVICZ et al., 1997; WORANOVICZ-BARREIRA, 1999a,b), desta forma, tem sido discutida a utilização da técnica de caracterização estrutural de polissacarídeos, como uma ferramenta auxiliar para a classificação e identificação destes organismos (TEIXEIRA et al., 1995).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração PFK2, contém vários sinais na região de C-1 ( $\delta$  108.0, 102.2, 101.0, 98.0 e 96.1) (Figura 8A), e em conjunto com os

derivados per-O-metilados (Tabela 5), mostram uma estrutura bastante ramificada, e de grande complexidade.

FIGURA 8- Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  das frações PFK2 (A), e do seu produto de hidrólise ácida parcial (TFA 0,1M, 8h) PFK2-8 (B), em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$



O sinal de C-1 das unidades de Galf em  $\delta$  108.0 (Figura 8A), provavelmente corresponde aos terminais não redutores, em concordância com os dados de metilação (Tabela 5). Na figura 8A também podem ser observados sinais em  $\delta$  83.1 e 81.5, os quais devem ser provenientes de unidades de Galf.

TABELA 5 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2; galactoglucomanana), obtida do talo liquênico de *T. flavicans*

Alditol acetatos parcialmente metilados <sup>1</sup>	FRAÇÃO (mol %)		Tipo de ligação <sup>2</sup>
	PFK2	PFK2-8	
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	2	5	TNR
2-Me-Rha	2	-	→3,4)-Rha-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	6	11	TNR
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	8	4	→2)-Glc-(1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	3	-	→3)-Glc-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	-	4	→4,6)-Glc-(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	4	13	TNR
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	2	6	→2)-Man-(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	2	3	→4)-Man-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	7	17	→6)-Man-(1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	6	1	→2,6)-Man-(1→
3,6-Me <sub>2</sub> -Man	3	3	→2,4)-Man-(1→
4-Me-Man	-	7	→2,3,6)-Man-(1→
3-Me-Man	23	9	→2,4,6)-Man-(1→
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Galf	1	3	TNR
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	-	3	TNR
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	-	2	→6)-Gal-(1→
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	5	-	→3,4 ou 5)-Gal-(1→
2,4 ou 3,5	6	-	→3,6 ou 2,4)-Gal-(1→
2-Me-Gal	12	-	→3,4 ou 5,6)-Gal-(1→

<sup>1</sup> Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>2</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

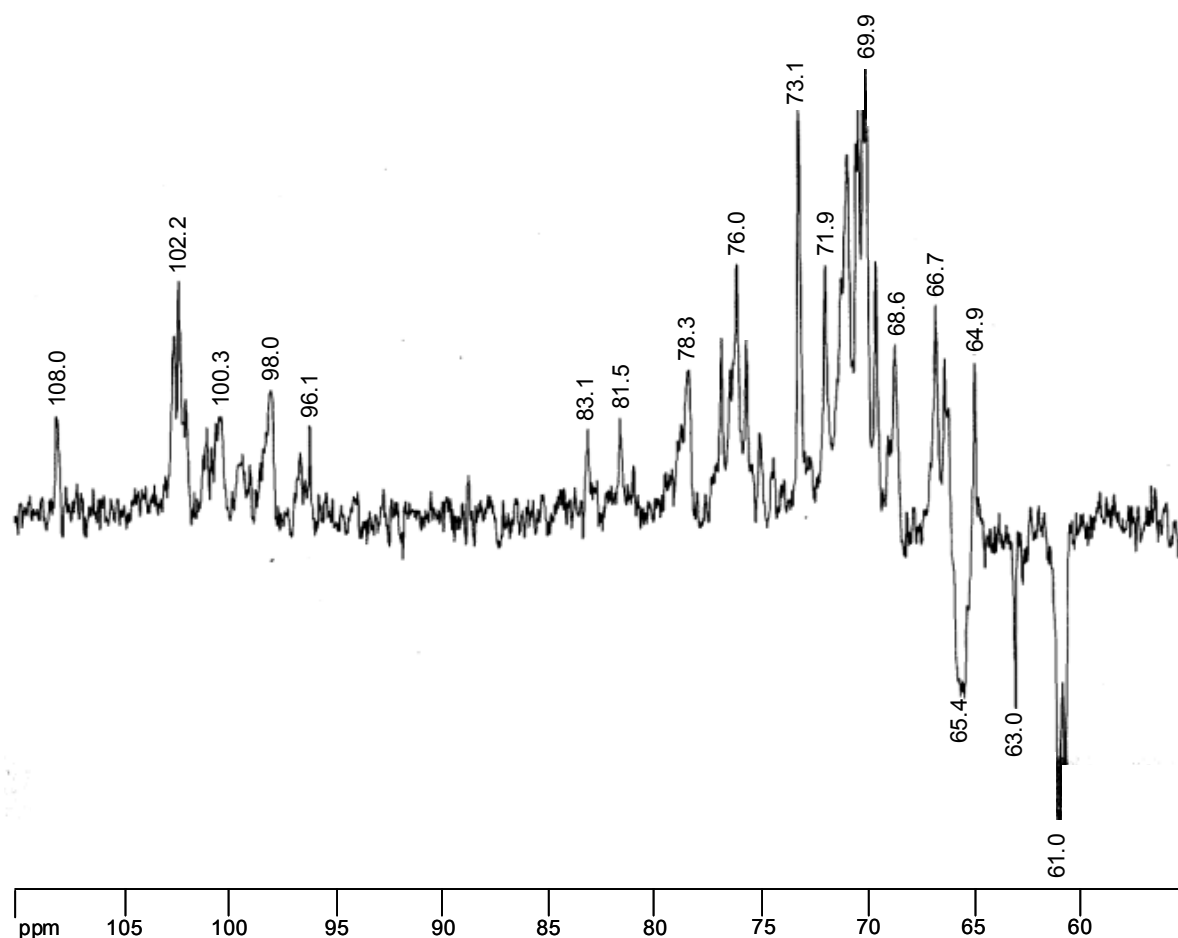
TNR – Terminal não redutor

A complexidade da estrutura, observada no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 8A) foi confirmada pela análise de metilação, devido à grande diversidade de derivados acetilados parcialmente O-metilados (Tabela 5). Estes sinais correspondem principalmente aos terminais não redutores de Man $p$ , conforme indicado pelo derivado 2,3,4,6-Me $_4$ -Man e Glc $p$ , conforme indicado pelo derivado 2,3,4,6-Me $_4$ -Glc. Também foram observados os derivados metilados referentes a unidades de Man $p$  2-O- (3,4,6-Me $_3$ -Man), 4-O- (2,3,6-Me $_3$ -Man), 6-O- (2,3,4-Me $_3$ -Man), 2,6-di-O- (3,4-Me $_2$ -Man), 2,4-di-O- (3,6-Me $_2$ -Man) e 2,4,6-tri-O- (3-Me-Man) substituídas.

Tratando-se de uma estrutura de grande complexidade, esta foi submetida a uma hidrólise ácida parcial, de acordo com a metodologia descrita na seção Material e Métodos, item 3.7.5, com o objetivo de eliminar algumas ramificações, tornando menos complexa a análise dos resultados de RMN- $^{13}\text{C}$  e metilação.

O produto da hidrólise ácida parcial da fração PFK2 foi denominado de PFK2-8. Quando comparados os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração nativa e do seu produto de hidrólise (Figura 8), observa-se o desaparecimento dos sinais correspondentes às unidades de Gal $f$ . Ao analisar os dados de metilação (Tabela 5), observa-se o aumento dos derivados parcialmente O-metilados referentes aos terminais não redutores de Man $p$ , Glc $p$ , e às unidades de  $\alpha$ -D-Man $p$  6-O-substituídas, sugerindo uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Man $p$  (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas.

Estes dados foram confirmados pelo espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do tipo DEPT, pela inversão dos sinais correspondentes a C-6 ligado, observados na região de  $\delta$  66.0-65.0 (Figura 9). Também pode ser observada a presença de sinais invertidos de C-6 livre, em  $\delta$  63.0 das unidades de Gal $f$ , e em  $\delta$  61.0 e 60.8 das hexoses piranosídicas.

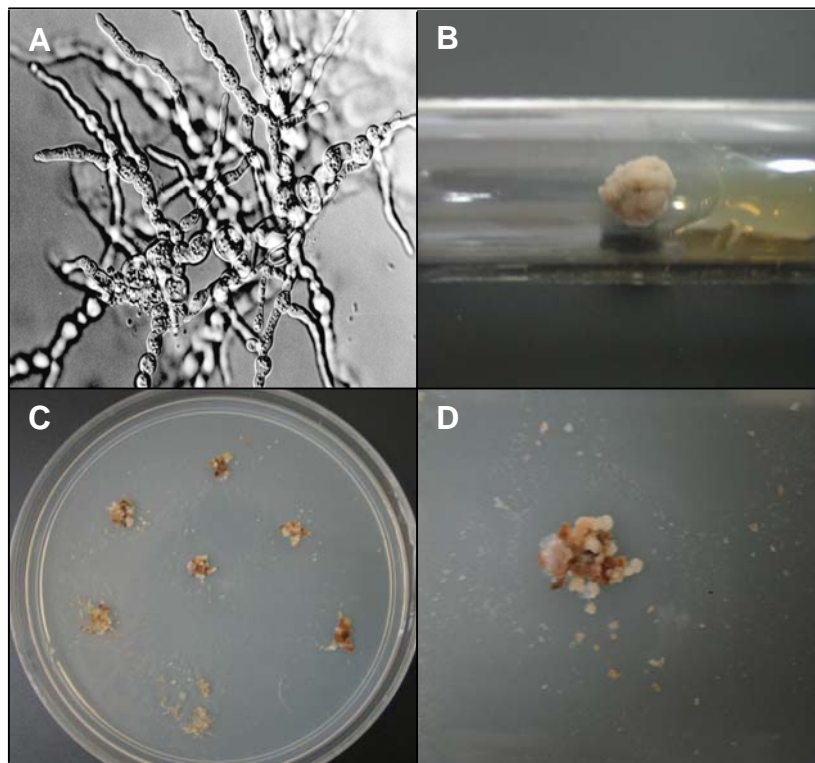
FIGURA 9 - Espectro de DEPT da fração PFK2, obtida do talo liquênico de *T. flavicans*

De acordo com os dados de composição monossacarídica, RMN- $^{13}\text{C}$ , DEPT e metilação, esta estrutura (fração PFK2) consiste de um heteropolissacarídeo complexo, provavelmente uma galactoglucomanana, com uma cadeia principal formada por unidades de  $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}$ -ligadas, semelhante às galactomananas descritas para os fungos liquenizados.

## 4.2 CULTIVO APOSSIMBIÓTICO DO MICOBIONTE

Após o isolamento do micobionte pela técnica de isolamento de esporos (YOSHIMURA et al., 2002), este foi mantido em estufa a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ , em meio TM sólido, para que primeiramente houvesse o desenvolvimento micelial (Figura 10A), e o posterior crescimento de uma colônia axênica (Figura 10B). Após incubação por um período de 6 meses, a colônia do micobionte, já desenvolvida, foi macerada e os fragmentos transferidos para placas de petri contendo meio sólido (LBM) para o cultivo e obtenção do material de estudo (Figura 10C). Para a realização do cultivo em meio líquido, as colônias desenvolvidas (Figura 10D) foram, por sua vez, maceradas e inoculadas em frascos erlenmeyers de 2 l, contendo 250 ml de meio líquido (S4).

FIGURA 10 - Micélio (A); colônia após 6 meses de incubação (B); placa de petri com colônias do micobionte (C) e detalhe de uma colônia do micobionte isolado do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans* (D)



Passados 90 dias de cultivo em meio líquido, este foi filtrado, com o objetivo de separar as colônias do micobionte do meio de cultivo. As colônias liofilizadas (2,73 g) foram então, submetidas aos processos de extração descritos, para obtenção das frações polissacarídicas (Figura 11).

Após 180 dias de cultivo em meio sólido, as colônias foram retiradas uma a uma, de maneira que não ocorresse a remoção de pedaços do meio, o que poderia interferir na composição do micobionte, devido à presença do Ágar. Após este procedimento foram obtidos 8,71 g de material, que foi submetido aos processos de extração descritos, para obtenção das frações polissacarídicas.

#### 4.3 POLISSACARÍDEOS DO MICOBIONTE ISOLADO

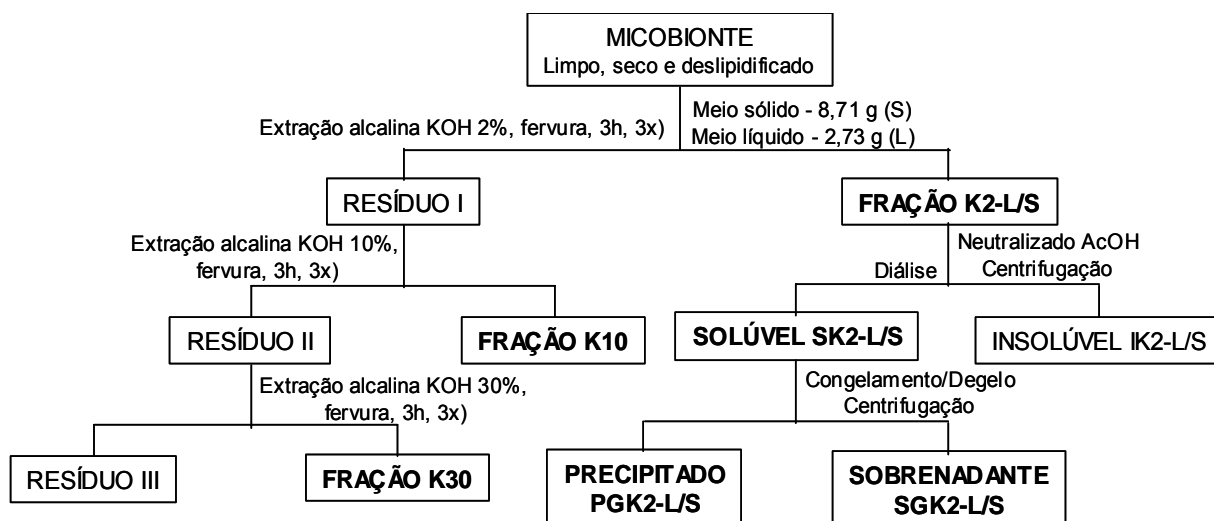
O micobionte obtido após cultivo em meio líquido forneceu 2,73 g, e em meio sólido 8,71 g. Os micélios foram submetidos à extração com acetona, em banho-maria, sob refluxo a 60°C, para remoção de pigmentos e demais substâncias lipossolúveis. O extrato apresentou um rendimento de 14,45% para o meio líquido (EACL), e 1,62% para o meio sólido (EACS). Estas frações foram reservadas para avaliações posteriores, quanto a sua composição lipídica.

O material residual obtido após deslipidificação foi submetido a sucessivas extrações alcalinas (KOH 2%, 10% e 30%), sob refluxo em banho fervente (Figura 11), conforme metodologia descrita.

As frações resultantes dos sucessivos processos de purificação foram analisadas quanto à composição monossacarídica, homogeneidade e por espectroscopia de RMN -  $^{13}\text{C}$ .



FIGURA 11 - Esquema de obtenção das frações polissacarídicas, a partir do microbionte cultivado apossimbioticamente



Os extratos alcalinos, obtidos por extração com KOH 2% (K2-L, K2-S; para o microbionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente) foram neutralizados com ácido acético, resultando na formação de precipitados para ambos, os quais foram separados por centrifugação (6451 x g, 15 min). Após diálise, as frações insolúveis após neutralização (IK2-L e IK2-S) apresentaram um rendimento de 6,69% e 12,41%, respectivamente, enquanto que as solúveis (SK2-L e SK2-S) apresentaram um rendimento de 37% e 13%, respectivamente.

As frações insolúveis (IK2-L e IK2-S) apresentaram-se compostas majoritariamente por galactose. Mas quando analisadas por RMN-<sup>13</sup>C, não foi observado assinalamento para o núcleo de <sup>13</sup>C (dado não mostrado).

As fração solúveis (SK2-L e SK2-S) apresentaram uma composição monossacarídica bastante semelhante (Tabela 6), sendo compostas principalmente por Man e Glc, além de Rha e Gal.

TABELA 6 – Rendimento e composição monossacarídica das frações obtidas do micobionte isolado de *Teloschistes flavicans*, cultivado em meio líquido e sólido

FRAÇÃO	RENDIMENTO (g %)	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (g %)*				
		Rha	Ara	Man	Gal	Glc
SK2-L <sup>1</sup>	37	9	—	40	9	42
SGK2-L <sup>2</sup>	14	7	—	52	16	25
SK2-S <sup>1</sup>	13	9	—	43	8	40
SGK2-S <sup>2</sup>	8	14	5	50	12	19

\* Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>1</sup> Extratos brutos obtidos após extração alcalina, KOH 2%, do micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente.

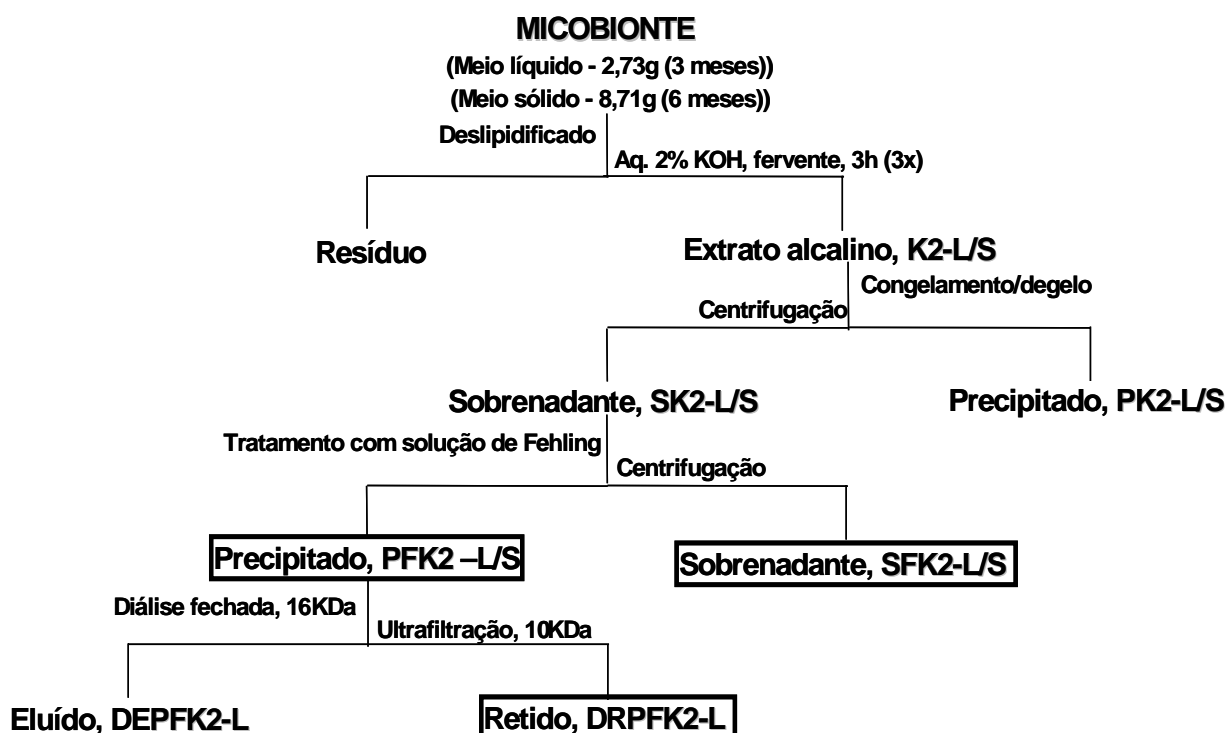
<sup>2</sup> Sobrenadantes obtidos após processo de congelamento e degelo, do micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente.

Posteriormente, as frações solúveis (SK2-L e SK2-S) foram submetidas aos sucessivos processos de congelamento e degelo (Figura 12), para a separação dos polissacarídeos solúveis, daqueles insolúveis em água fria. Tanto para o micobionte cultivado em meio líquido, quanto para o cultivado em meio sólido foram originadas frações sobrenadantes de congelamento e degelo denominadas SGK2-L (14%) e SGK2-S (8%) e precipitados de congelamento e degelo, PGK2-L (1%) e PGK2-S (1%). Devido ao baixo rendimento das frações insolúveis em água fria, estas (PGK2-L e PGK2-S) foram guardadas para experimentos futuros.

#### 4.3.1 Caracterização Estrutural das Frações SGK2-L e SGK2-S (sobrenadante de congelamento e degelo da extração KOH 2%)

As frações SGK2-L e SGK2-S (Figura 12), quanto à composição monossacarídica são principalmente compostas por manose (52 e 50%, respectivamente, Tabela 6).

FIGURA 12 - Esquema de obtenção das frações polissacarídicas correspondentes à fração SK2 (sobrenadante de congelamento e degelo da extração KOH 2%), a partir do micobionte cultivado aposimbioticamente



Comparando-se as composições monossacarídicas das frações SK2-L e SK2-S com a dos sobrenadantes de congelamento e degelo (SGK2-L e SGK2-S, Tabela 6), pode-se em um primeiro momento inferir que não há diferença significativa entre os polissacarídeos produzidos pelo micobionte cultivado em meio líquido e sólido.

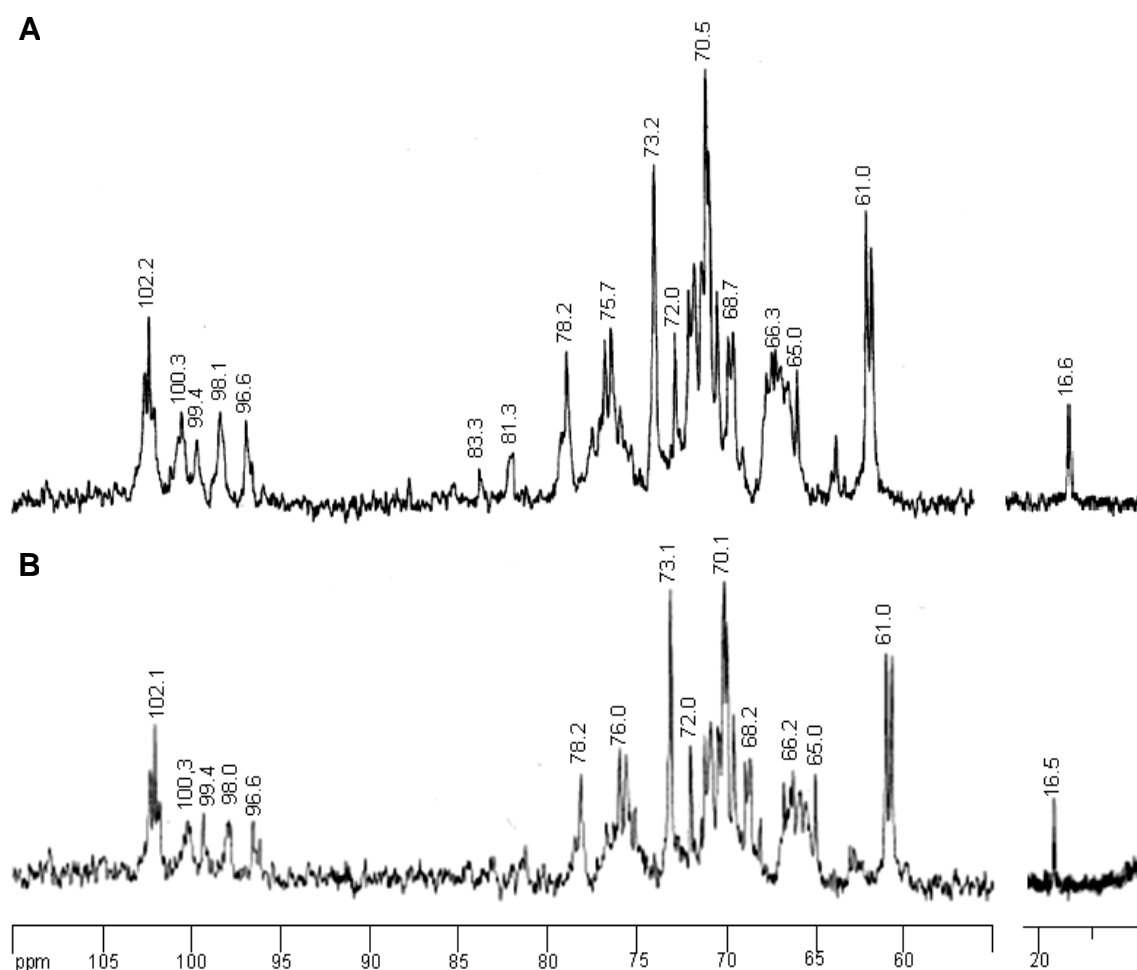
Estas frações (SK2-L, SK2-S, SGK2-L e SGK2-S; Tabela 6) são majoritariamente compostas de Man e Glc, além da presença de Gal e Rha. Estes dados são condizentes com os resultados obtidos para os sobrenadantes de congelamento e degelo, observados no líquen intacto, *Teloschistes flavicans* (REIS, 2001), em fungos liquenizados do gênero *Cladonia* (WORANOVICZ-BARREIRA, 1999), e em *Collema leptosporum* (PRADO-MALUCELLI, 1996). O teor de glucose, 19% e 25%, apresentado nas frações SGK2-S e SGK2-L, respectivamente, apresenta-se semelhante ao observado para o líquen intacto, *Teloschistes flavicans*, a partir do qual o micobionte em questão foi isolado, mas superior ao observado

para os líquens *Cladonia* e *Collema leptosporum*.

Analisando as composições monossacarídicas (Tabela 6), e tendo como base, que os principais polissacarídeos de fungos liquenizados são  $\alpha$ - e  $\beta$ - glucanas e galactomananas (GORIN *et al.*, 1993), não é possível inferir pureza a nenhuma das frações apresentadas até o momento.

A fração solúvel após neutralização, do micobionte cultivado em meio sólido (SK2-S) foi submetida à análise de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 13A), apresentando uma mistura de polissacarídeos, a qual pode ser observada devido à presença de inúmeros sinais na região anomérica. Após fracionamento por congelamento e degelo, o sobrenadante (SGK2-S) submetido novamente à análise de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 13B), ainda apresentou caráter estrutural heterogêneo, o que sugeriu a necessidade de novos passo de purificação.

FIGURA 13 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das frações K2-S (extrato bruto da extração KOH 2%, do micobionte cultivado em meio líquido) em  $\text{ME}_2\text{SO}-d_6$  (70°C) (A), e SK2-S (sobrenadante de congelamento e degelo da fração K2-S) em  $\text{D}_2\text{O}$  (50°C) (B)



Após o tratamento com solução de Fehling, foram originados uma fração sobrenadante e um precipitado de Fehling. Estas novas frações foram denominadas SFK2-L e SFK2-S para os sobrenadantes e PFK2-L e PFK2-S para os precipitados, respectivamente, para os meios líquido e sólido.

#### 4.3.1.1 Fração SFK2-L (sobrenadante de Fehling do micobionte cultivado em meio líquido)

Com relação aos sobrenadantes de Fehling, a fração SFK2-L apresentou ser composta principalmente por Man (68%), além de Glc (19%), Rha (10%) e Gal (3%) (Tabela 7). Devido ao baixo rendimento, a fração SFK2-S não foi caracterizada, mas sua composição monossacarídica mantém o mesmo padrão de monossacarídeos da apresentada na tabela 7 para a fração SFK2-L.

TABELA 7 - Composição monossacarídica das frações sobrenadantes de Fehling (SFK2), obtidas a partir do micobionte isolado de *Teloschistes flavicans*, cultivado em meio líquido e sólido

FRAÇÃO	RENDIMENTO (g %)	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA* (g %)			
		Rha	Man	Gal	Glc
SFK2-L <sup>1</sup>	9	10	68	3	19
SFK2-S <sup>2</sup>	1	7	64	8	21

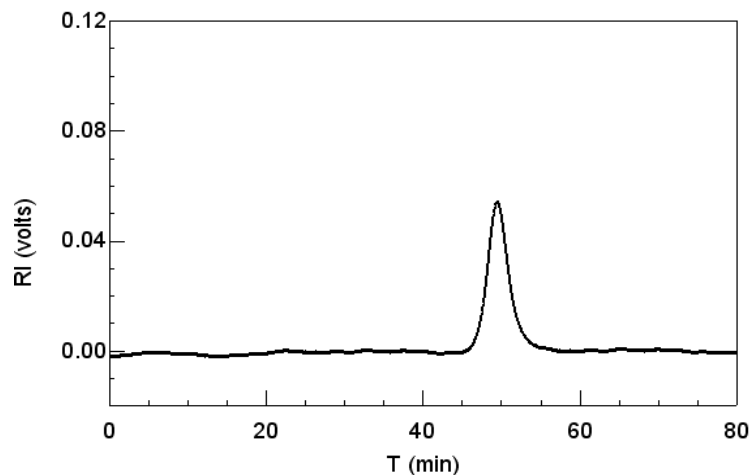
\* Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>1</sup> Sobrenadante de Fehling, do micobionte cultivado em meio líquido;

<sup>2</sup> Sobrenadante de Fehling, do micobionte cultivado em meio sólido.

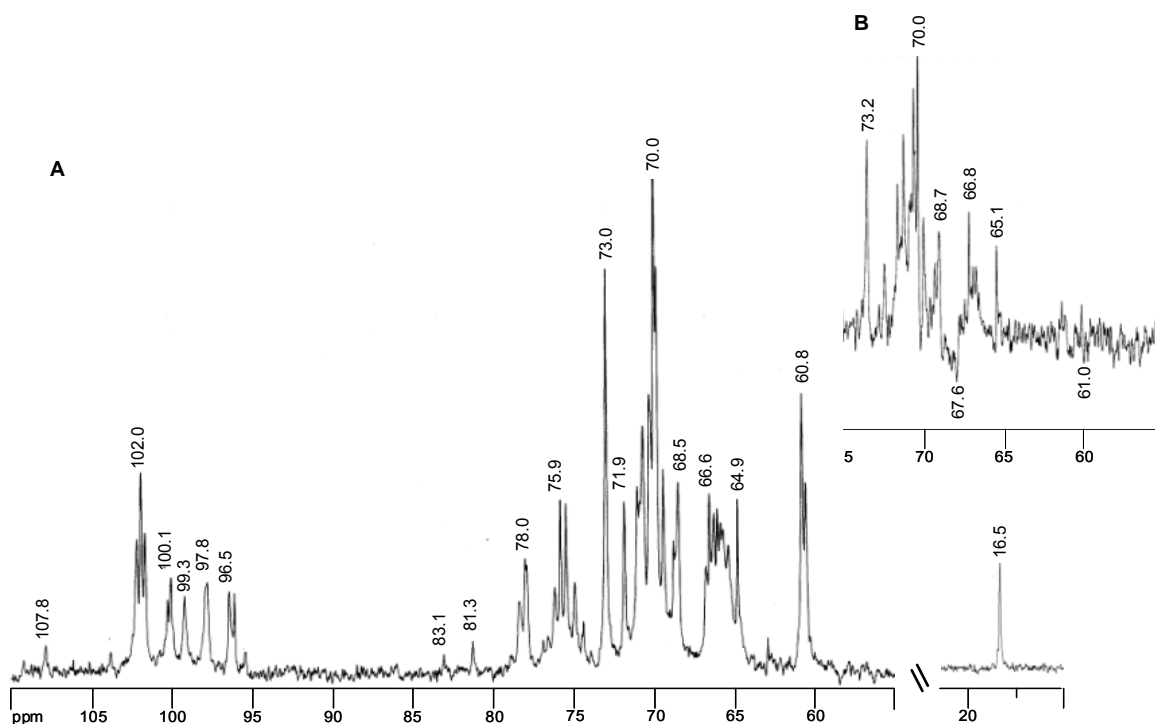
O passo seguinte foi a avaliação da homogeneidade da fração SFK2-L. Para isso foi realizada sua análise em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS). Como apresentado na figura 14, trata-se de uma fração homogênea, cuja massa molar é  $M_w = 98.550 \text{ g/mol}$  ( $dn/dc = 0,170$ ).

FIGURA 14 - Perfil de eluição da fração SFK2-L (solubilizada em solução nitrito) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 Mol/l (nitrito de sódio) e 0,2 g/l de  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de  $0,22\ \mu\text{m}$ )



A análise de RMN  $^{13}\text{C}$  sugere que esta fração seja composta por uma molécula complexa, bastante ramificada, devido ao grande número de sinais na região de C-1 (Figura 15).

FIGURA 15 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (A) e DEPT (B) da fração SFK2-L (obtida a partir do micobionte cultivado em meio líquido), em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $30^\circ\text{C}$ )



Esta complexidade foi confirmada pela análise de metilação, pela presença de inúmeros derivados parcialmente-O-metilados (Tabela 8).

TABELA 8 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (SFK2-L), obtida do micobionte isolado de *T. flavicans*.

<b>Acetatos de alditol parcialmente O-metilados<sup>1</sup></b>	<b>Fração (mol %) SFK2L</b>	<b>Tipo de ligação<sup>2</sup></b>
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	11	TNR
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	17	TNR
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	2	→4,6)-Glc-(1 →
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	4	→3,6)-Glc-(1 →
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	7	TNR
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	5	→2)-Man-(1 →
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	17	→6)-Man-(1 →
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	11	→2,6)-Man-(1 →
3-Me-Man	11	→2,4,6)-Man-(1 →
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal f	2	TNR
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	13	→3)-Gal-(1 →

<sup>1</sup> Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução (NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>2</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

TNR – Terminal não redutor.

Em conjunto com os dados de metilação, o sinal em  $\delta$  107.8 sugere a presença de uma pequena quantidade de terminais não redutores de Gal f (2%). São observados ainda, terminais não redutores de Rha (11%), Glc (17%) e Man (7%) (Tabela 8). Também podem ser destacados os derivados 2,3- (2%) e 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc p (4%), 2,3,4-Me<sub>3</sub>- (17%), 3,4-Me<sub>2</sub>- (11%) e 3-Me-Man (11%), além do derivado 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal (13%) (Tabela 8).

Sendo assim, a fração SFK2-L foi caracterizada como um heteropolissacarídeo, com estrutura complexa, confirmada pelos resultados de RMN-<sup>13</sup>C e metilação, os quais indicam tratar-se de uma estrutura bastante ramificada, cuja cadeia principal provavelmente seja formada por unidades de  $\alpha$ -D-Man p-(1→6) ligadas, substituídas principalmente e O-2 ou O-2,4 por unidades de manose, galactose e ou glucose.

#### 4.3.1.2 Fração PFK2-L (precipitado de Fehling do micobionte cultivado em meio líquido)

As frações PFK2-L e PFK2-S referentes ao micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente, também foram analisadas. Estas frações serão discutidas separadamente por tratar-se de um heteropolissacarídeo (PFK2-L) e de um homopolissacarídeo (PFK2-S).

A fração PFK2-L quando analisada na forma de acetatos de alditol apresentou ser composta por Man (37%), Gal (14%), Glc (14%) e Rha (5%) (Tabela 9).

TABELA 9 - Composição monossacarídica das frações precipitados de Fehling (PFK2), obtidas a partir do micobionte *Teloschistes flavicans*, cultivado em meio líquido e sólido

FRAÇÃO	Rendimento (g%)	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (g %)*			
		Rha	Man	Gal	Glc
PFK2-L <sup>1</sup>	4	5	37	14	14
16RPFK2-L <sup>2</sup>	2	13	22	22	13
DRPFK2-L <sup>3</sup>	2	20	64	1	15
PFK2-S <sup>1</sup>	8	—	3	2	95

\* Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>1</sup> Precipitado de Fehling, do micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente;

<sup>2</sup> Material retido após diálise fechada, em membrana com limite de exclusão de 16 kDa, da fração PFK2-L;

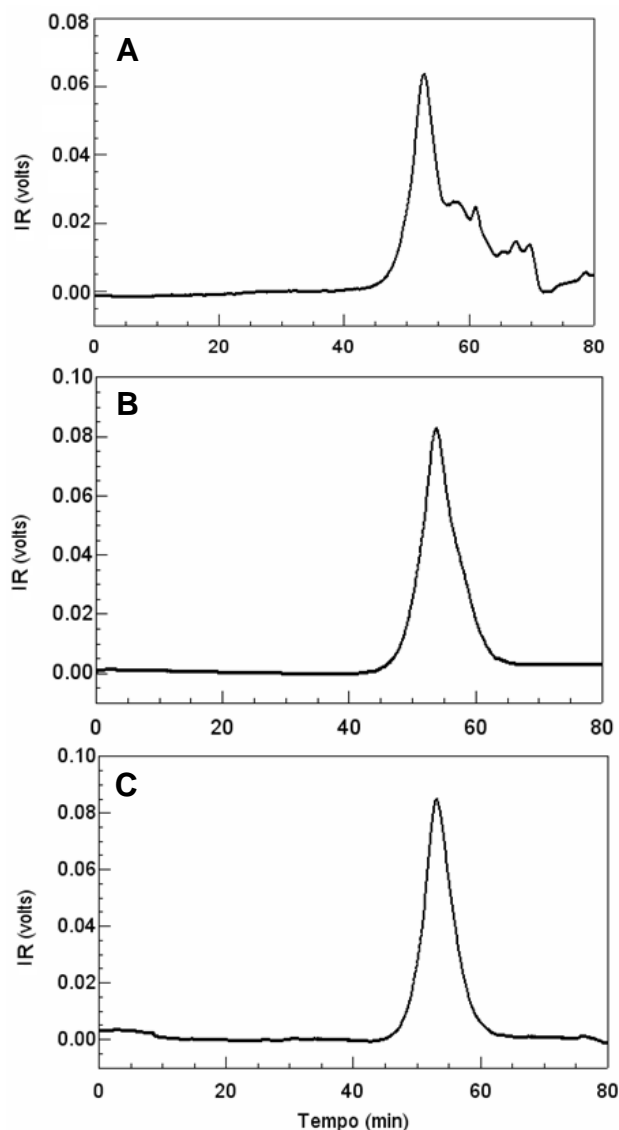
<sup>3</sup> Material retido após ultrafiltração, em membrana com limite de exclusão de 10 kDa, da fração 16RPFK2-L.

Devido ao perfil heterogêneo analisado em HPSEC-MALLS (Figura 16A), esta fração foi submetida a sucessivos processos de purificação.

Primeiramente a fração PFK2-L liofilizada foi submetida à diálise fechada em membrana com limite de exclusão de 16 kDa (Figura 16B), seguida de ultrafiltração em membrana com tamanho de poro de 10 kDa. O material retido após a ultrafiltração, denominado de DRPFK2-L apresentou um perfil homogêneo quando analisado por HPSEC-MALLS (Figura 15C).



FIGURA 16 - Perfis de eluição das frações PFK2-L<sup>1</sup> (A), 16RPFK2-L<sup>2</sup> (B) e DRPFK2-L<sup>3</sup> (C), em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 Mol/l (nitrito de sódio) e 0,2 g/l de NaN<sub>3</sub> (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22 µm)



<sup>1</sup> PFK2-L – Precipitado de Fehling obtido a partir do extrato KOH 2%, do micobionte cultivado em meio líquido.

<sup>2</sup> 16RPFK2-L – Material retido após diálise em membrana com limite de exclusão de 16 kDa.

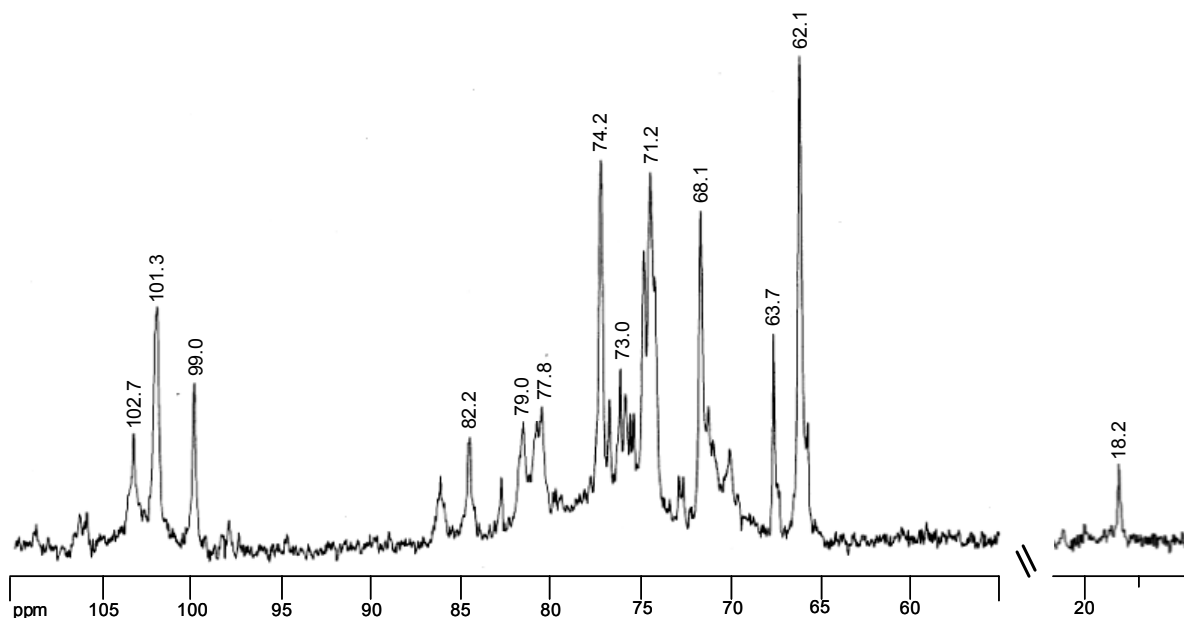
<sup>3</sup> DRPFK2-L – Material retido após ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa.

Esta nova fração, DRPFK2-L (2%) apresentou Man como o principal monossacarídeo (64%), além de Rha (20%), Glc (15%) e Gal (1%) (Tabela 9).

Quando analisada por RMN <sup>13</sup>C (Figura 17) foi possível observar que se trata de uma estrutura complexa, devido aos sinais presentes na região de C-1, onde

foram observados três picos de maior intensidade em  $\delta$  102.7, 101.3 e 99.0.

FIGURA 17 - Espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  da fração PFK2-L em  $\text{D}_2\text{O}$  (50°C).



Devido ao baixo rendimento desta fração a estrutura fina deste heteropolímero não pôde ser definida, sendo necessárias análises adicionais para sua determinação, ou ainda partir de uma maior quantidade de material, para obtenção das frações polissacarídicas.

Considerando os resultados obtidos para a fração DRPFK2-L, observa-se uma estrutura referente a um heteropolissacarídeo complexo, diferente daquela obtida para o talo liquênico de *T. flavicans*.

#### 4.3.1.3 Fração PFK2-S (precipitado de Fehling do micobionte cultivado em meio sólido)

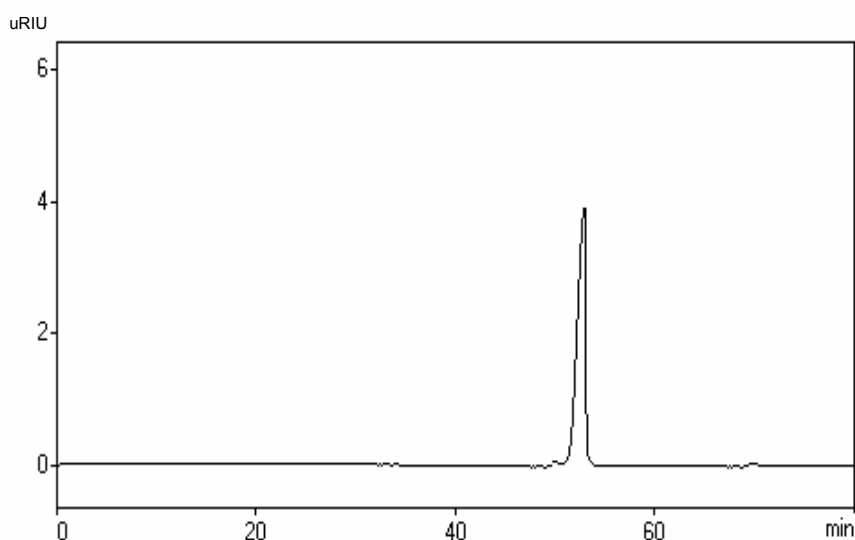
Anteriormente foi discutida a fração obtida do precipitado de Fehling, a partir do extrato KOH 2%, do micobionte cultivado em meio líquido.

Diferente da fração PFK2-L, a fração PFK2-S, obtida a partir de tratamento com solução de Fehling, do extrato KOH 2%, apresenta-se constituída de um

homopolissacarídeo. De acordo com a composição monossacarídica majoritária de glucose (95%), foi possível constatar a presença de uma glucana.

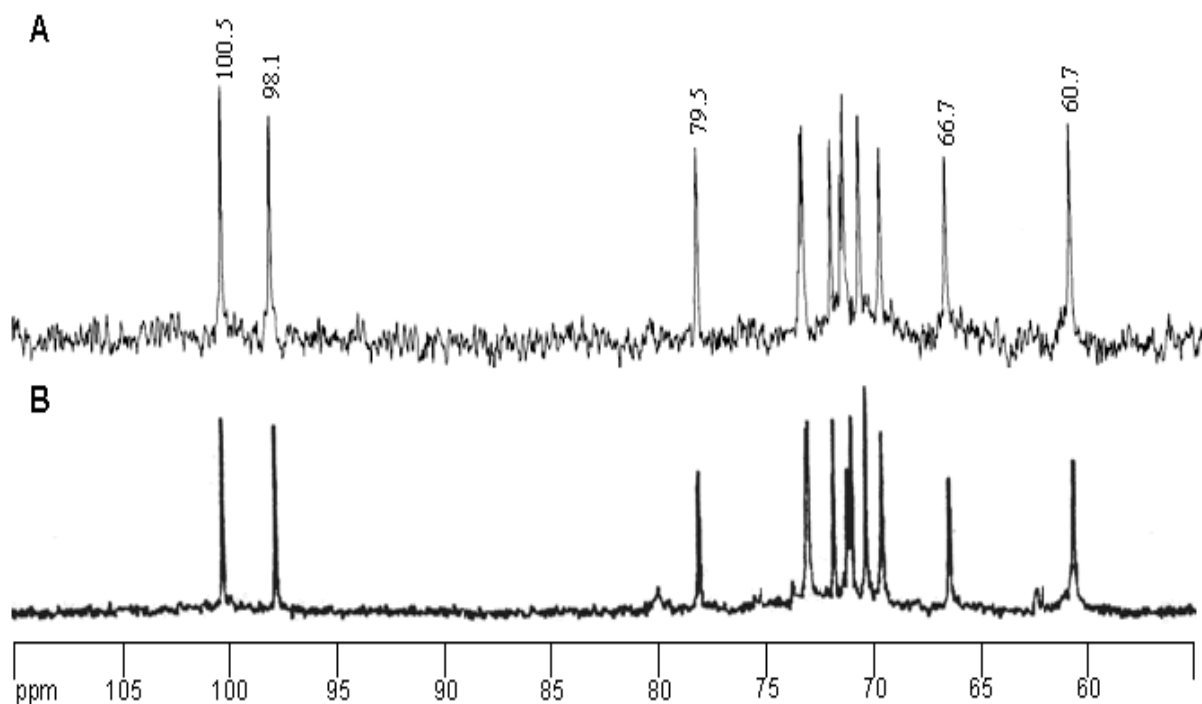
A fração PFK2-S mostrou um perfil de eluição homogêneo, quando analisada por HPSEC-MALLS (Figura 18), apresentando um pico único, com  $M_w = 43\text{KDa}$  ( $dn/dc = 0,155$ ).

FIGURA 18 - Perfil de eluição da fração PFK2-S em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a índice de refração (IR) (HPSEC) (solubilizada em solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 Mol/l (nitrito de sódio) e 0,2 g/l de  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ )



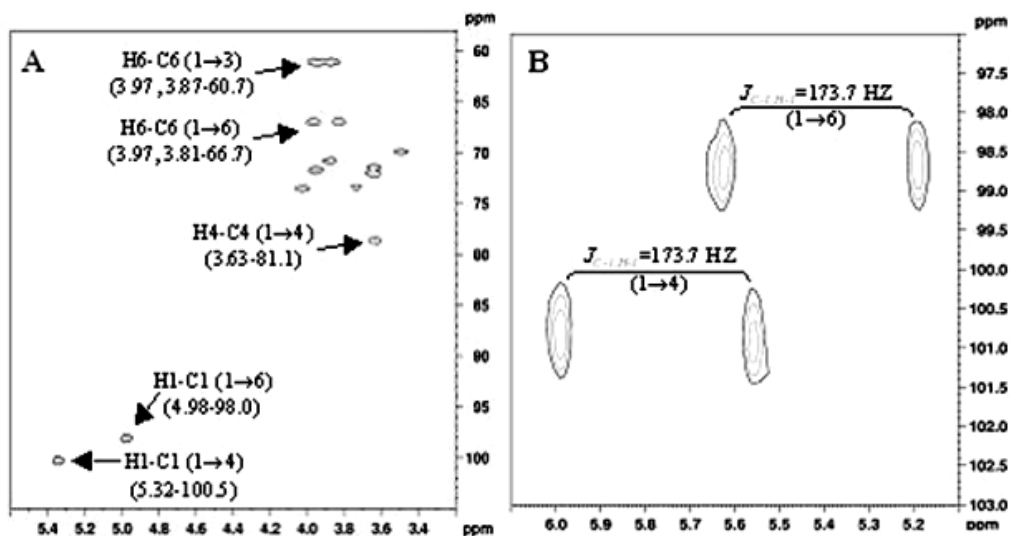
Seu espectro de RMN - $^{13}\text{C}$  apresenta 12 sinais (Figura 19A), os quais são consistentes com os de uma estrutura formada por um grupo de duas unidades alternadas. Espectro idêntico a este foi obtido de uma fração isolada de forma semelhante, a partir do talo intacto do fungo liquenizado *T. flavicans* (Figura 19B). A fração obtida do talo havia sido previamente isolada (REIS et al., 2002), mas no presente trabalho, foram realizadas análises adicionais para confirmação da estrutura.

FIGURA 19 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração PFK2-S em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  (70°C), uma  $\alpha$ -D-glucana (1→4), (1→6), obtida do micobionte cultivado de *T. flavicans* (A), em comparação com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da  $\alpha$ -D-glucana obtida do talo liquênico de *T. flavicans* (REIS et al., 2002) (B)



Análises adicionais mostraram que os sinais de C-1 em  $\delta$  100.5 e 98.1 referem-se as unidades de  $\alpha$ -D-Glcp (1→4)- e (1→6)-ligadas, respectivamente. As configurações do tipo  $\alpha$  foram determinadas através das características de ressonância de próton observadas no espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC (Figura 20A) e pela constante de acoplamento determinada por análise de RMN  $^{13}\text{C}$  acoplado (BERNIER, 1958). As unidades de Glcp (1→4)- e (1→6)-ligados apresentaram configurações do tipo  $\alpha$ , em virtude dos valores de  $J_{\text{C-1}, \text{H-1}}$  de 173.7Hz (Figura 20B), obtidos a partir dos sinais de H-1 em  $\delta$  5.34 (100.5) e  $\delta$  4.97 (98.1).

FIGURA 20 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC (A), e COSY (B) da fração PFK2-S uma  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do micobionte cultivado de *T. flavicans*, em  $\text{D}_2\text{O}$  (70°C)



As análises de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMQC e COSY da fração PFK2-S forneceram informações sobre a estrutura das ligações, sugerindo a presença de grupo  $\text{CH}_2$  substituído, devido aos sinais em  $\delta$  66.7, com H-6 em  $\delta$  3.98 e H-6' em  $\delta$  3.83.

Os dados de metilação desta fração (PFK2-S) mostraram que se trata de uma estrutura linear, devido a ausência de terminais não redutores, apresentando apenas os derivados metilados correspondentes as unidades 6-O- (52%) e 4-O-substituídas (48%) (Tabela 10).

TABELA 10 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PFK2-S;  $\alpha$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 6)) obtida a partir do micobionte de *Teloschistes flavicans* cultivado em meio sólido

Acetatos de alditol parcialmente O-metilados <sup>1</sup>	FRAÇÃO (mol %)	Tipo de Ligação <sup>2</sup>
	PFK2-S	
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	Tr <sup>3</sup>	Glc- (1 $\rightarrow$
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	48	$\rightarrow$ 4)-Glc- (1 $\rightarrow$
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	52	$\rightarrow$ 6)-Glc- (1 $\rightarrow$

<sup>1</sup> Analisado em GC-MS após metilação, hidrólise ácida total, redução ( $\text{NaB}^2\text{H}_4$ ) e acetilação.

<sup>2</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

<sup>3</sup> Tr = Traços (abaixo de 1%).

Os resultados obtidos para a fração PFK2-S caracterizaram uma  $\alpha$ -D-glucana linear, com ligações (1→4) e (1→6) alternadas. Estrutura idêntica a esta foi anteriormente descrita para o talo simbiótico do fungo liquenizado *Teloschistes flavicans* (REIS et al., 2002), a partir do qual o presente micobionte foi isolado, sendo suas propriedades de RMN mais profundamente avaliadas no presente trabalho. Sugerindo, desta forma que seja originada a partir do micobionte, sem interferência do componente fotobionte.

A presente estrutura, uma  $\alpha$ -D-glucana linear com ligações (1→4) e (1→6) alternadas, é classificada como uma pululana, com uma relação molar das ligações sendo 1:1. Esta relação é diferente de outras pululanas isoladas, como a do exopolissacarídeo produzido por *Aureobasidium pullulans*, que possui as ligações (1→4) e (1→6) na relação molar de 2:1 (JENNINGS e SMITH, 1973), semelhante à encontrada em *Tremella mesenterica* (WAKSMAN et al., 1977). Outro tipo de relação foi descrito para o fungo *Cyttaria hariatii*, sendo de 1:2 para as ligações (1→4) e (1→6), respectivamente.

#### 4.3.2 Caracterização Estrutural da Fração K10 (extração KOH 10%)

O extrato K10, correspondente à extração com KOH 10% foi obtido tanto para o micobionte cultivado em meio líquido (K10-L), quanto para o cultivado em meio sólido (K10-S).

Após extração com KOH 10%, assim como para a extração com KOH 2%, os extratos foram neutralizados com ácido acético, desta vez não houve formação de frações insolúveis, diferente do observado para os extratos K2-L e K2-S. Sendo assim, os extratos K10-L e K10-S foram dialisados e liofilizados.

Estes extratos foram avaliados quanto à suas composições monossacarídicas, as quais se apresentaram semelhantes (Tabela 11).

TABELA 11 - Composição monossacarídica das frações derivadas do extrato KOH 10%, obtidas a partir do micobionte cultivado em meio líquido (L) e sólido (S)

FRAÇÃO	RENDIMENTO (g %)	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (g %)*					
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
K10-L <sup>1</sup>	13	2	4	—	15	10	69
SK10-L <sup>2</sup>	9	8	5	—	—	—	87
PK10-L <sup>3</sup>	3	—	—	—	7	3	90
K10-S <sup>1</sup>	5	2	3	2	11	9	73
SK10-S <sup>2</sup>	3	5	—	—	16	11	68
PK10-S <sup>3</sup>	1	—	—	—	2	2	96

\* Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>1</sup> Extrato KOH 10% do micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente;

<sup>2</sup> Sobrenadante de congelamento e degelo da fração K10, do micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente;

<sup>3</sup> Precipitado de congelamento e degelo da fração K10, do micobionte cultivado em meio líquido e sólido, respectivamente.

Posteriormente, os extratos, K10-L e K10-S foram submetidos ao processo de congelamento e degelo, originando frações solúveis (SK10-L e SK10-S) e insolúveis em água fria (PK10-L e PK10-S), para os meios líquido e sólido, respectivamente.

Quando comparadas às composições monossacarídicas das frações sobrenadantes (SK10-L e SK10-S) e precipitados (PK10-L e PK10-S) para os meios líquido e sólido observa-se a similaridade destas frações (Tabela 11).

Quando analisadas em HPSEC-MALLS, SK10-L e SK10-S apresentaram perfis heterogêneos, sendo necessários processos adicionais de purificação, desta forma estas frações foram reservadas para estudos futuros.

#### 4.3.2.1 Caracterização Estrutural da fração PK10 (precipitado de congelamento e degelo da extração KOH 10%)

Os precipitados de congelamento e degelo (PK10-L e PK10-S), obtidos a partir do extrato KOH 10%, apresentam glucose como o principal constituinte

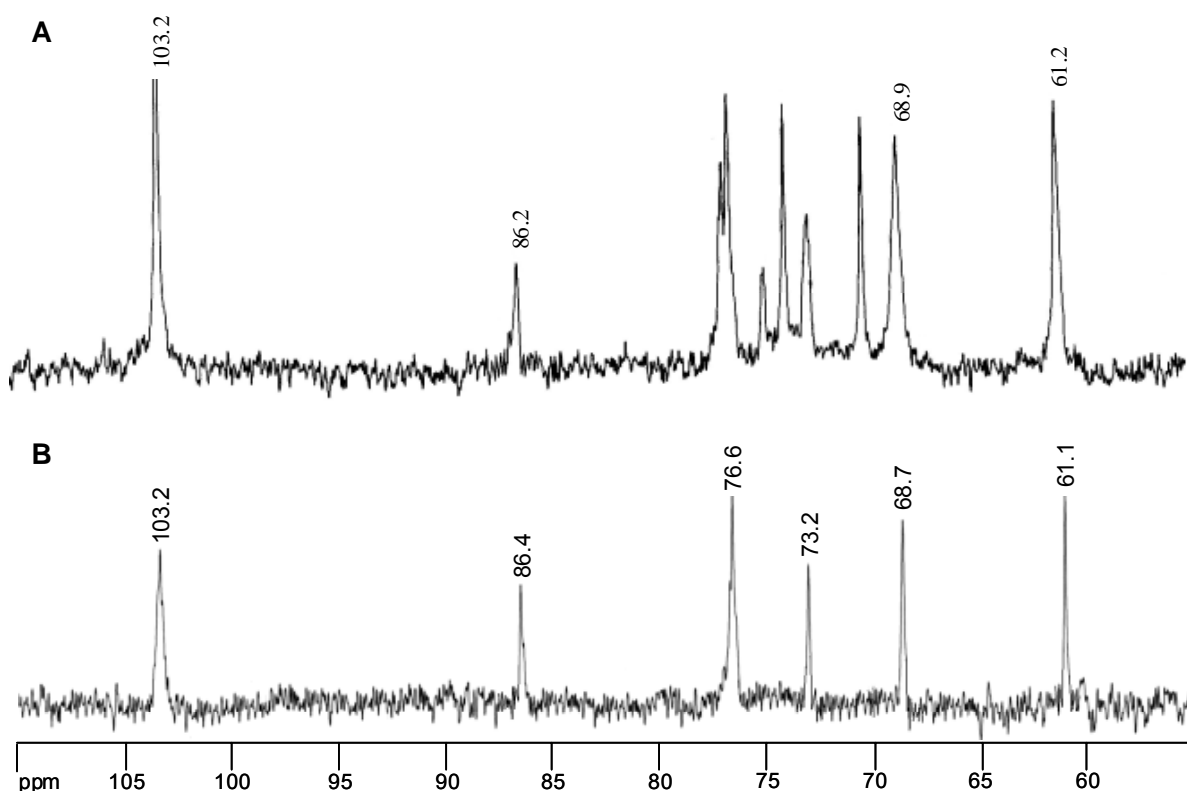
monossacarídico, correspondendo a 90% para a fração PK10-L (meio líquido) e 96% para a fração PK10-S (meio sólido).

Ambas as frações foram então, analisadas por RMN  $^{-13}\text{C}$  (Figura 21), em que foi possível observar diferenças quanto aos polissacarídeos produzidos pelo micobionte cultivado em meio líquido e sólido.

No espectro de RMN  $^{-13}\text{C}$  da fração PK10-L (Figura 21A) podem ser observados os mesmos sinais observados para a fração PK30, obtida em maior rendimento, e caracterizada a seguir. Por este motivo a estrutura, provavelmente correspondente a uma  $\beta$ -D-glucana, com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), não será detalhada neste item.

O espectro de RMN  $^{-13}\text{C}$  da fração PFK10-S (Figura 21B) apresentou seis sinais, em  $\delta$  103.2 (C-1), 86.4 (C-3 substituído), 76.6, 73.2, 68.7 e 61.2 (C-6), característicos de uma  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada.

FIGURA 21 - Espectro de RMN  $^{-13}\text{C}$  das frações PK10-L, provavelmente uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida para o micobionte *T. flavicans* cultivado em meio líquido (A), e PK10-S, uma  $\beta$ -D-glucana linear, (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, obtida para o micobionte *T. flavicans* cultivado em meio sólido (B) (solubilizadas em  $\text{ME}_2\text{SO}-D_6$  (50°C))





Para a conclusão da caracterização das estruturas presentes nas frações PK10-L e PK10-S são necessárias análises adicionais de metilação e espectroscopia.

A presença de uma  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, não havia sido relatada para o fungo liquenizado *Teloschistes flavicans*, em estudos anteriores, em que os homopolissacarídeos caracterizados foram uma  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 4) (1 $\rightarrow$ 6) (1:1), denominada de pululana, e uma  $\beta$ -D-glucana ramificada, com ligações (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) (REIS et al., 2002). Glucanas do tipo laminarana, ou seja,  $\beta$ -D-glucanas lineares (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas foram descritas para algumas espécies de fungos liquenizados, dentre elas: *Ramalina celastri* (STUELP et al., 1999), *Ramalina usnea* (GORIN e IACOMINI, 1984), *Stereocaulum ramulosum* (GORIN e IACOMINI, 1985), sendo que todas possuem como fotobionte a microalga verde do gênero *Trebouxia*. Esta verificação levou CARBONERO e colaboradores (2002) a sugerir que a origem polissacarídica da laminarana fosse a partir do fotobionte. Posteriormente, a mesma estrutura foi descrita para as espécies *Ramalina dendriscoides*, *R. gracilis*, *R. fraxinea*, *R. peruviana* (CORDEIRO et al., 2003), *Cladina arbuscula*, *C.confusa*, *C. substenius*, *Roccella decipiens* e *Leptogium sp.* (CARBONERO, 2005). Para o fungo liquenizado *Ramalina peruviana*, a estrutura da laminarana também foi obtida para o micobionte após isolamento e cultivo apossimbiótico (CORDEIRO et al., 2004). Desta maneira, pode-se inferir que tal estrutura, uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), tenha sua origem a partir do micobionte, sem a interferência do fotobionte (*Trebouxia*), como sugerido anteriormente.

#### 4.3.3 Caracterização Estrutural da fração K30 (extração KOH 30%)

O micobionte cultivado em meio sólido foi, ainda, submetido à extração com KOH 30%, resultando no extrato K30-S. Este extrato foi obtido somente para o micobionte cultivado em meio sólido, pois a massa residual após extração com KOH 10% não foi suficiente para a obtenção de um bom rendimento em extrações mais drásticas.

O extrato K30-S apresentou como composição monossacarídica Glc (78%), Gal (10%), Man (8%), além de Rha (2%) e Ara (2%) (Tabela 12). Esta fração

foi submetida ao processo de congelamento e degelo, originando uma fração solúvel (SK30-S) e outra insolúvel em água fria (PK30-S). A fração PK30-S foi obtida com um rendimento de 5% (435 mg), sendo majoritariamente composta por glucose (94%) (Tabela 12).

TABELA 12 - Composição monossacarídica das frações K30-S, obtida a partir do micobionte cultivado em meio sólido

FRAÇÃO	RENDIMENTO (g %)	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (g %)*				
		Rha	Ara	Man	Gal	Glc
K30-S <sup>1</sup>	6	2	2	8	10	78
SK30-S <sup>2</sup>	1	2	2	12	11	73
PK30-S <sup>3</sup>	5	Tr	—	2	4	94

\* Analisado em GC-MS após hidrólise ácida total, redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>1</sup> Extrato KOH 30%;

<sup>2</sup> Sobrenadante de congelamento e degelo do extrato K30-S

<sup>3</sup> Precipitado de congelamento e degelo do extrato K30-S.

A análise de metilação desta fração mostrou a presença de uma estrutura ramificada, com a presença de terminais não redutores (16%), e unidades de Glcp 3-O- (51.5%) e 6-O- (16.5%) substituídas, e 3,6-di-O-substituídas (16%) (Tabela 13).

TABELA 13 - Análise por metilação da fração precipitado de Fehling (PK30-S;  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)) obtida a partir do micobionte de *Teloschistes flavicans* cultivado em meio sólido

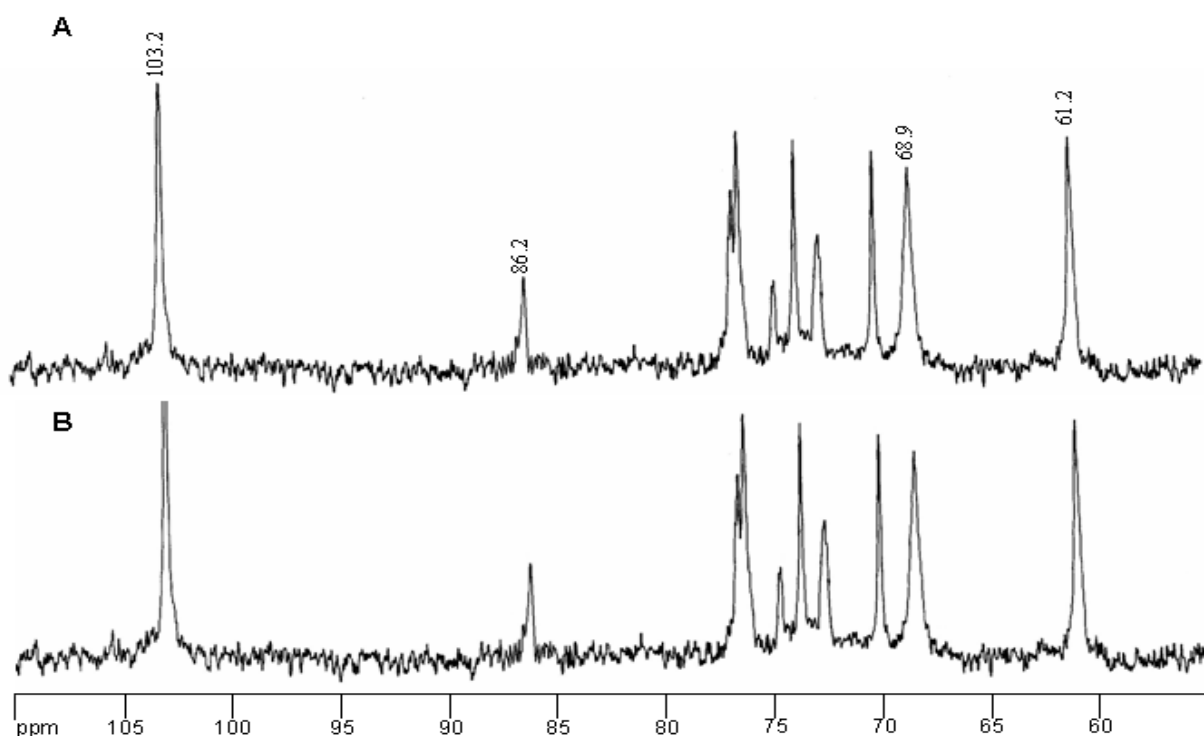
Acetatos de alditol parcialmente O-metilados <sup>1</sup>	FRAÇÃO (mol %)	Tipo de Ligação <sup>2</sup>
	PK30	
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	16	Glc- (1 $\rightarrow$
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	16.5	$\rightarrow$ 6)-Glc- (1 $\rightarrow$
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	51.5	$\rightarrow$ 3)-Glc- (1 $\rightarrow$
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	16	$\rightarrow$ 3,6)-Glc- (1 $\rightarrow$

<sup>1</sup> Analisado em GC-MS após metilação, metanólise, hidrólise ácida total, redução (NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub>) e acetilação.

<sup>2</sup> Baseado nos derivados acetilados parcialmente O-metilados.

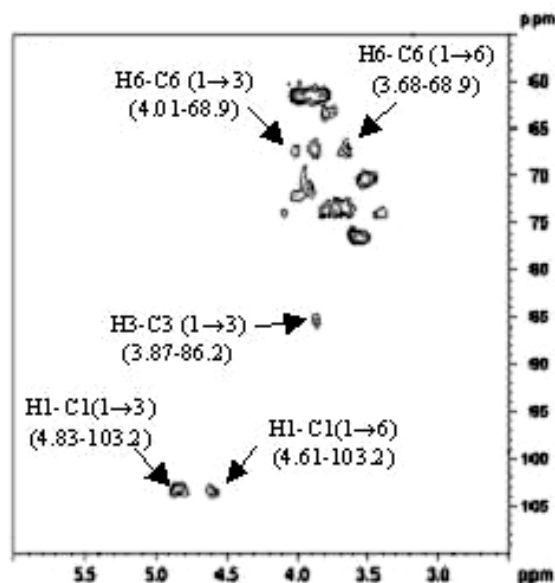
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , utilizando  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  como solvente, mostrou sinais predominantes de C-1 em campo baixo, em  $\delta$  103.2, e de C-3 em  $\delta$  86.2 das unidades 3-O-substituídas, além de um sinal de menor intensidade em  $\delta$  86.9, das unidades 3,6-di-O-substituídas (Figura 22A). Este espectro apresenta-se idêntico ao obtido para a fração PK10-L apresentada anteriormente (item 4.3.2.1), e ao obtido para uma fração isolada de forma semelhante, a partir do talo líquênico de *Teloschistes flavicans* (Figura 22B) (REIS et al., 2002).

FIGURA 22 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração PK30-S em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  (70°C), uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do micobionte cultivado de *T. flavicans* (A), em comparação com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -D-glucana obtida do talo líquênico de *T. flavicans* (REIS et al., 2002) (B)



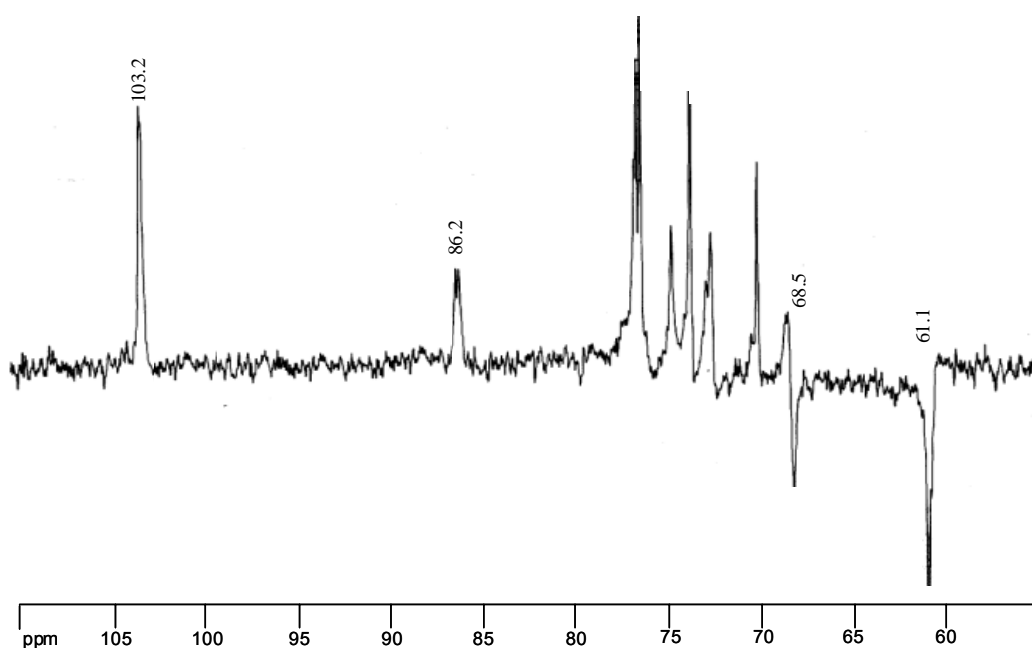
Em seu espectro de HMQC (Figura 23) dois sinais de H-1 em  $\delta$  4.81 e 4.60 são observados, confirmando a existência de dois tipos de ligação, (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), respectivamente.

FIGURA 23 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMQC da fração PK30-S uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do microbionte cultivado de *T. flavicans*, em  $\text{D}_2\text{O}$  (70°C)

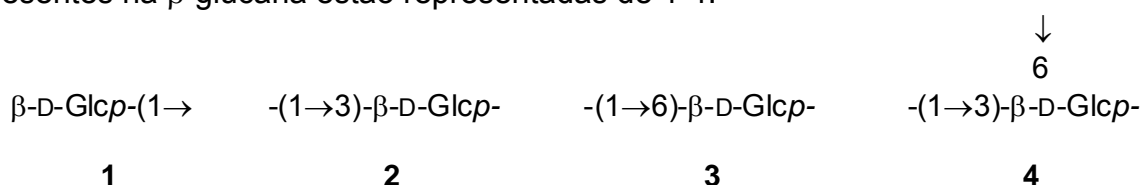


A presença de unidades de glucose, (1 $\rightarrow$ 6) ligadas também foi comprovada pela inversão do sinal em  $\delta$  68.5, correspondente aos C-6 ligados quando a fração PK30-S foi analisada por DEPT-135 (Figura 24). Com a confirmação da presença de dois tipos de ligação, (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6), por meio de análises de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMQC e DEPT-135, observa-se que houve uma sobreposição de sinais de C-1 em  $\delta$  103.2.

FIGURA 24 - Espectro de DEPT da fração PK30-S, uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), obtida do microbionte cultivado de *T. flavicans*, em  $\text{D}_2\text{O}$  (70°C)



Foi realizada uma degradação controlada de Smith, para a determinação da cadeia principal da estrutura presente na fração PK30-S. No entanto, apenas material de baixo massa molar foi formado, uma vez que não houve precipitação polissacarídica pela adição de excesso de etanol à solução aquosa de PK30-S, indicando que a presente glucana não apresenta uma cadeia principal (1→3)-ligada. O mesmo resultado foi obtido quando a fração isolada do talo liquênico foi degradada sob as mesmas condições. Sendo assim, as estruturas provavelmente presentes na  $\beta$ -glucana estão representadas de 1-4:



Como mencionado anteriormente, esta mesma estrutura foi previamente encontrada para o talo liquênico de *T. flavicans* (REIS et al., 2002). As configurações do tipo  $\beta$  foram demonstradas pelos sinais de H-1, em campo alto, em  $\delta$  4.53 e 4.22 na relação molar de 3:1, para as ligações (1→3) e (1→6), respectivamente.

$\beta$ -D-glucanas ramificadas (1→3)- e (1→6)-ligadas têm sido descritas desde 1987 como sendo típicas de micobiontes basidiomicetos, como em *Dictyonema glabratum* (inicialmente *Cora pavonia*) (IACOMINI et al., 1987). PRADO e colaboradores (1999) isolaram uma glucana similar em *Collema leptosporum*. Estes fungos liquenizados possuem as cianobactérias *Scytonema* e *Nostoc*, respectivamente, como fotobiontes (AHMADJIAN, 1993), o que veio a sugerir que seriam responsáveis pela origem destas  $\beta$ -D-glucanas.

No entanto a estrutura da  $\beta$ -D-glucana ramificada, (1→3)- e (1→6)-ligada, isolada e caracterizada para o ascolíquen *T. flavicans*, cujo fotobionte corresponde à alga verde do gênero *Trebouxia*, veio questionar a origem deste polissacarídeo. Com a caracterização da mesma estrutura para o micobionte isolado de *T. flavicans*, cultivado axenica e apossimbioticamente, foi sugerida a origem micobionte, desta estrutura.

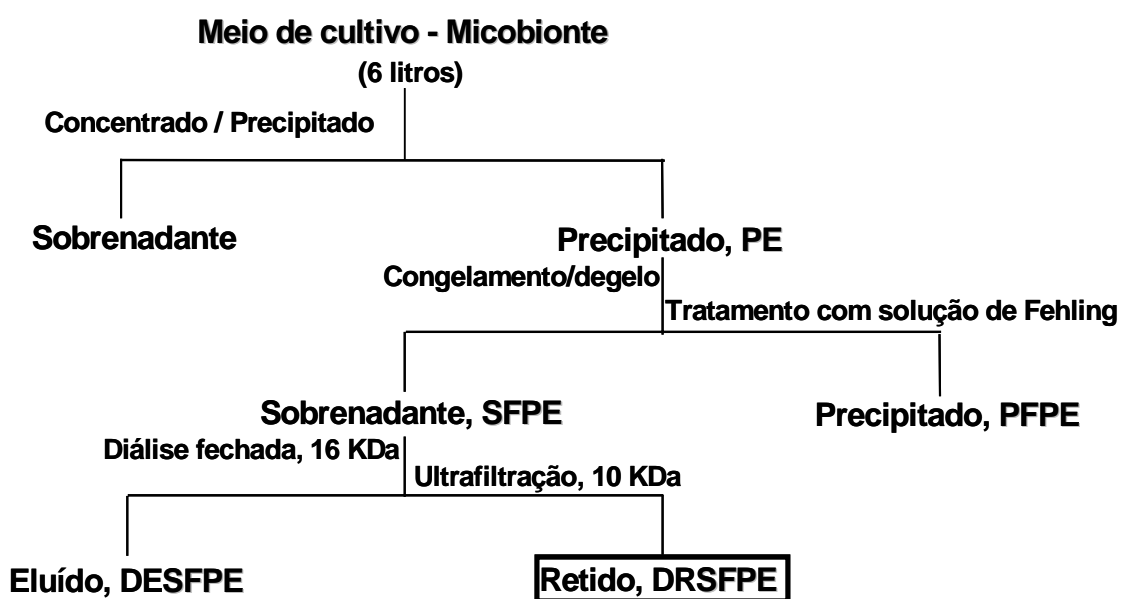
O presente estudo com polissacarídeos isolados a partir do micobionte de *T. flavicans* cultivado apossimbioticamente, mostrou que a  $\alpha$ -D-glucana linear com ligações (1→4) e (1→6) na relação molar de 1:1 (pululana), e a  $\beta$ -D-glucana

ramificada com ligações (1→3) e (1→6) na relação molar de 3:1 são produzidas pelo micobionte, sem a participação do fotobionte *Trebouxia*. CORDEIRO e colaboradores obtiveram resultados semelhantes estudando polissacarídeos isolados de *Ramalina peruviana*, tanto do talo liquênico quanto do micobionte cultivado, em que uma galactomanana, uma  $\alpha$ -D-glucana com ligações (1→3) e (1→4) (nigerana, 1:1), e uma  $\beta$ -D-glucana (1→3)-ligada (laminarana), são produzidas pelo componente fúngico, sem a participação do fotobionte, também do gênero *Trebouxia*.

#### 4.4 EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS PELO MICOBIONTE

Quando cultivado em meio líquido, o micobionte foi primeiramente separado do meio de cultivo por filtração, para que pudesse ter sua composição química avaliada. O meio de cultivo, agora sem as colônias do micobionte foi concentrado e precipitado em excesso de etanol, para avaliação de uma possível presença de exopolissacarídeos (Figura 25).

FIGURA 25 - Esquema de obtenção das frações exopolissacarídicas, a partir do meio líquido de cultivo aposimbótico, do micobionte *Teloschistes flavicans*



Na figura 25, podem ser observados os passos seguidos para a obtenção da fração polissacarídica de interesse, a partir da concentração e precipitação etanólica do meio líquido, onde o micobionte foi cultivado apossimbioticamente.

O precipitado etanólico, denominado PE (703,6 mg), foi analisado quanto a sua composição monossacarídica, na forma de acetatos de alditol, apresentando Man (44%) e Glc (32%), além de Gal (14 %) e Rha (10%) (Tabela 14). Posteriormente, PE foi submetido ao fracionamento por congelamento e degelo, e por não resultar em fração insolúvel em água fria, foi a seguir submetido à precipitação via reativo de Fehling (Figura 25). Desta precipitação foram originadas duas novas frações, um sobrenadante de Fehling (SFPE; 444,6 mg) e um precipitado de Fehling, (PFPE; 158,2 mg) os quais foram analisados quanto a sua composição monossacarídica (Tabela 14).

TABELA 14 - Composição monossacarídica do precipitado etanólico obtido a partir do meio líquido de cultivo do micobionte *Teloschistes flavicans*

FRAÇÃO	RENDIMENTO (g %)	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (g %)						
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
PE <sup>1</sup>	100	10	—	—	—	44	14	32
PFPE <sup>2</sup>	17	2	—	—	—	17	22	59
SFPE <sup>2</sup>	40	12	—	1	—	74	3	10
SFPE16E <sup>3</sup>	20	12	10	4	—	51	16	7
SFPE16R <sup>3</sup>	13	7	2	2	1	67	4	17
DRSFPE <sup>4</sup>	10	5	—	—	—	70	17	8

\*Analisado por GLC, como acetatos de alditol.

<sup>1</sup> Precipitado etanólico do meio líquido.

<sup>2</sup> Precipitado e sobrenadante de fehling, respectivamente.

<sup>3</sup> Frações eluídas e retida, respectivamente, após diálise em membrana com limite de exclusão de 16 kDa para o sobrenadante de fehling (SFPE).

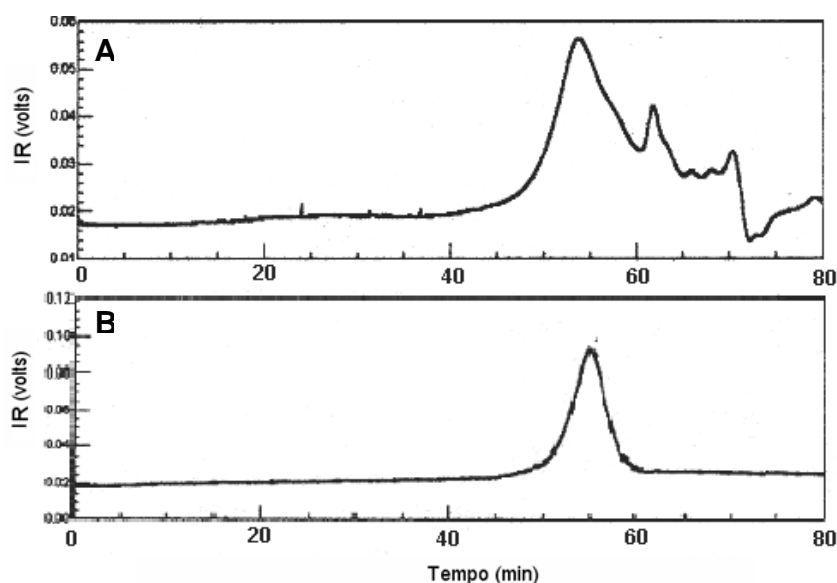
<sup>4</sup> Fração retida após ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10kDa.

No que se refere à composição monossacarídica, pode ser observado (Tabela 11) que o precipitado etanólico é muito semelhante em composição aos extratos alcalinos KOH 2% (Tabela 4), com teor de glucose e manose em torno de 40%.

Após a precipitação de Fehling, houve uma nítida separação das frações, uma vez que o precipitado apresentou-se composto principalmente por glucose (59%), enquanto o sobrenadante majoritariamente constituído de manose (74%), sugerindo assim a presença de heteropolissacarídeos.

A fração sobrenadante de Fehling foi analisada quanto a sua homogeneidade, apresentando-se heterogênea (Figura 26A), foi dialisada em sistema fechado, em uma membrana com limite de exclusão de 16 kDa, originando duas subfrações. Uma referente ao material eluído, denominada 16ESFPE (261,8 mg), e outra referente ao material retido, 16RSFPE (147,5 mg). Como esta última ainda apresentou um pequeno ombro em seu perfil de eluição, quando analisada em HPSEC-MALLS foi submetida a uma ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa. Com este procedimento foram originadas duas frações a partir da fração 16RSFPE, uma correspondente ao material eluído, denominada DESFPE (50 mg), e outra referente ao material retido, DRSFPE (87 mg), que apresentou um perfil de eluição homogêneo (Figura 26B).

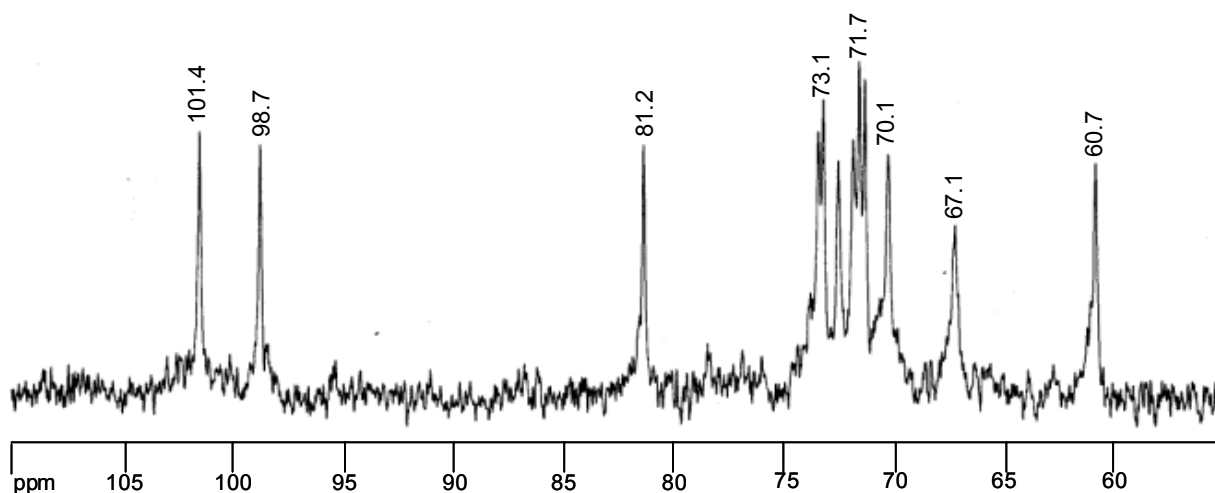
FIGURA 26 - Perfis de eluição das frações SFPE (A), DRSFPE (B), em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a multidetecção – espalhamento de luz (LS) e índice de refração (IR) (HPSEC-MALLS) (solubilizada em solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 Mol/l (nitrito de sódio) e 0,2 g/l de  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio) e filtradas em membrana com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ )





A fração purificada (DRSFPE) foi, então, submetida à análise de RMN -  $^{13}\text{C}$  (Figura 27).

FIGURA 27 - Espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  da fração DRSFPE, retida após ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 10 kDa, em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ), obtida a partir da precipitação etanólica do meio líquido de cultivo do microbionte *T. flavicans*



Quando analisada por RMN -  $^{13}\text{C}$ , a fração DRSFPE apresenta dois sinais principais na região de carbono anomérico, em  $\delta$  101.4 e 98.7, caracterizando um heteropolissacarídeo provavelmente formado por estruturas repetitiva ou grupos alternados de unidades, entretanto estudos adicionais são necessários para a elucidação da estrutura fina deste polímero.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 *Teloschistes flavicans*

Como conclusões, para o talo liquênico de *Teloschistes flavicans* foi isolada e caracterizada uma galactoglucomanana, cuja cadeia principal é provavelmente formada por unidades de  $\alpha$ -D-Manp-(1→6)-ligadas;

Além desta estrutura, também foram isoladas as estruturas de uma  $\alpha$ -D-Glcp (1→4),(1→6) e de uma  $\beta$ -D-Glcp (1→3),(1→6), ambas previamente isoladas e caracterizadas para o talo liquênico de *T. flavicans* (REIS et al., 2002).

### 5.2 MICOBIONTE ISOLADO

Frações muito semelhantes quanto à composição monossacarídica ao líquen de origem foram obtidas para o micobionte cultivado de forma axênica e aposimbioticamente em meio líquido e sólido;

Foram observadas algumas diferenças entre as frações polissacarídicas obtidas para o micobionte cultivado em meio líquido ou sólido, primeiramente para as frações precipitados de Fehling das extrações KOH 2%. Para o micobionte cultivado em meio líquido (PFK2-L), foi isolado e caracterizado um heteropolissacarídeo complexo, diferente do caracterizado para o talo liquênico, e para o micobionte cultivado em meio sólido (PFK2-S) foi isolada e caracterizada uma pululana, uma  $\alpha$ -D-glucana linear com ligações (1→4) e (1→6) alternadas na relação molar de 1:1, previamente descrita para o talo liquênico (REIS et al., 2002), em que apenas seu espectro de HMQC havia sido obtido. Desta maneira novos experimentos foram realizados, confirmando a presença da mesma estrutura para o micobionte isolado e cultivado em meio sólido. Pode-se sugerir que esta seja originada a partir do micobionte, sem a interferência do componente fotobionte.

Para a extração com KOH 10% foi identificada uma  $\beta$ -D-Glcp (1→3)-ligada, sendo isolada e caracterizada para o micobionte isolado de *T. flavicans*. Esta

estrutura foi observada para o micobionte cultivado em meio sólido (PK10-S), enquanto que em meio líquido uma fração correspondente (PK10-L), contendo uma  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6). Demonstrou-se, assim, a existência de uma diferença na produção de polissacarídeos para os meios líquido e sólido. Tal diferença pode ter sido provocada devido à composição do meio no qual o micobionte foi crescido.

Foi, ainda, isolada e caracterizada uma  $\beta$ -D-Glucana ramificada, com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6), para a fração PK30-S, referente à extração com KOH 30%, realizada apenas para o micobionte cultivado em meio sólido, devido ao baixo rendimento de massa do micobionte cultivado em meio líquido. Esta estrutura já havia sido previamente isolada e caracterizada para o líquen intacto (REIS et al., 2002). Análises complementares confirmaram a presença da mesma estrutura para o micobionte isolado e cultivado em meio sólido. Desta maneira sugere-se que a origem deste homopolissacarídeo se dê por intermédio do micobionte, sem a interferência do fotobionte *Trebouxia*, uma vez que este foi caracterizado tanto para o talo líquênico quanto para o micobionte isolado.

### 5.3 EXOPOLISSACARÍDEO

Para o meio líquido de cultivo de micobionte, foi avaliada a presença de exopolissacarídeos, sendo isolada e parcialmente caracterizada a estrutura de um heteropolissacarídeo, composto principalmente por Man (70%) e Gal (17%), além de Glc (8%) e Rha (5%). Este provavelmente seja composto por estruturas repetitivas, ou por unidades alternadas.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; MONTGOMERY, R.; SMITH, F. A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 74, p. 4970-4971, 1952.
- ADAM, W. W.; DEMIMING-ADAMS, B.; LANGE, O. L. Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. **Oecologia**, v. 94, n. 4, p. 576-584, 1993.
- AHMADJIAN, V. A guide to the algae occurring as lichen symbionts: Isolation, culture, cultural physiology and identification. **Phycologia**, 6: p. 127-160, 1967.
- AHMADJIAN, V. **The Lichen symbiosis**, New York, John Wiley and Sons, 2<sup>a</sup> ed. 1993.
- AHMADJIAN, V.; JACOBS, J. B. Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristate*. **Nature**, v. 289, p. 169-172, 1981.
- AHZAREM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; DOMENECH, J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M.; Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 67-72, 1997.
- AHZAREM, O.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BARASOAÍN, I.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. A characteristic water-soluble cell wall polysaccharide for *Fusarium* and *Gebberella* species. **Mycological Res.**, v. 104, p. 603-610, 2000a.
- AHZAREM, O.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. Heterogeneity of the genus *Myrothecium* as revealed by cell wall polysaccharides. **Archv. Microbiol.**, v. 173, p. 296-302, 2000b.
- ALBORN, O. Revision of the lichen genus *Teloschistes* in central and southern Africa. Nord. **J. Bot.**, v. 8, n. 5, p. 521-537, 1989.

BERNIER, M. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. **Can. J. Microbiol.** v. 4, p. 195-204, 1958.

BOISSIERE, J. C. Ultrastructural relationship between the composition and the structure of the cell wall of the mycobiont of two lichens. in: PEVELING, E. (ed.) Progress and problems in the lichenology in the Eighties. **Biblioteca Lichenologica**, v. 25, p. 117-132, 1987.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUELP, P. M.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 194, p. 65-69, 2001.

CARBONERO, E. R.; MONTAI, A. V.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 61, p. 681-686, 2002.

CARBONERO, E. R. **Polissacarídeos de fungos liquenizados contendo diferentes fotobiontes**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 119p, 2005.

CARBONERO, R. C.; CORDEIRO, L. M. C.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; S.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Galactomannans with novel structures from the lichen *Rocella decipiens* DARB. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1699-1705, 2005

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; FREITAS BUCHI, D.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against *HeLa* cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Submicroscopy Cytol. and Pathol.**, v. 29, p. 503-509, 1997.

CHANDA, N. B.; HIRST, E. L.; MANNERS, D. J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). **J. Chem. Soc.**, p. 1951-1958, 1957.

CIUCANU, I. AND KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CORDEIRO, L. M. C. **Caracterização estrutural de polissacarídeos extraídos do fotobionte isolado do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba. Dissertação de Mestrado. Departamento de bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 99p, 2000.

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus *Ramalina* – lichenized fungi – of three distinct habitats. **Phytochemistry**, v. 63, p. 967-975, 2003.

CORDEIRO, L. M. C. **Isolamento em cultura axênica de simbioses líquênicas e caracterização estrutural de seus polissacarídeos**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, p. 184, 2004.

CORDEIRO, L. M. C., STOCKER-WÖRGÖTTER, E., GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Elucidation of polysaccharide origin in *Ramalina peruviana* symbiosis. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 238, p. 79-84, 2004.

CORRADI DA SILVA, M. D. L. **Estudo de alguns carboidratos dos líquens *Sticta* sp e *Parmotrema cetratum* (Ach.) Hale**. Tese de Doutorado em Bioquímica- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 157p., 1992.

CRITTENDEN, P. D.; DAVID, J. C.; HAWKSWORTH, D. L.; CAMPBELL, F. S. Attempted isolation and success in the culturing of broad spectrum of lichen forming and lichenicolous fungi. **New Phytologist**, v. 130, n. 2, p. 267-297, 1995.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. Characteristics lichen products in cultures of chemotypes of the *Ramalina siliquosa* complex. **Mycology**, v. 84, p. 705-714, 1992.

CZECZUGA, B. XAVIER-FILHO, L. Investigations on carotenoids in lichens. VII. Some lichens from Brazil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 47, p. 243-246, 1987.

CZECZUGA, B.; SKULT, H. Carotenoids in lichens of southern Finland. **Ann. Bot. Fenn.**, v. 25, n. 3, p. 229-232, 1988.

DOMENECH, J.; PRIETO, A.; BARASOÁIN, I.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; BERNABÉ, M.; LEAL, A. Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paecilomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. **Microbiology**, v. 145, p. 2789-2796, 1999.

DYER, J. R. Use of periodate oxidations in biochemical analysis. **Methods Biochem. Anal.**, v. 3, p. 112-149, 1956.

ELIX, J. A.; WITTHON, A. A.; SARGENT, M. V. Recent progress in the chemistry of lichen substances. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 45, p. 103-224, 1984.

ELIX, J. A. **Biochemistry and secondary metabolites**. In: Nash III, T. H. Lichen Biology. Cambridge University Press, p. 1-7, 1996.

ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U. Antimicrobial activity and citotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 428-431, 1999.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. **Fungal Databases**. Beltsville, USA: Systematic Botany & Mycology Laboratory, USDA-ARS [<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>], 2004.

FONTAINE, T.; SIMENEL, C.; DUBREUCQ, G.; ADAM, O.; DELEPIERRE, M.; LEMOINE, J.; VORGIAS, C. E.; DIAQUIN, M.; LATGÉ, J. P. Molecular organization of the alkaline insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 594-607, 2000.

GALUN, M.; BRAUN, A.; FRENSDORFF, A.; GALUN, E. Hyphal walls of isolated lichen fungi. Autoradiographic localization of precursor incorporation and binding of fluorescein-conjugated lectins. **Arch. Microbiol.**, v. 108, p. 9-16, 1976.

GALUN, M. AND BUBRICK, P. Physiological interactions between partners of the lichen symbiosis. In **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series, v. 17, p. 362-401, 1984.

GARGAS, A.; DePRIEST, P. T.; GRUBE, M.; TEHLER, A. Multiple origins of lichen symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. **Science**, v. 268, p. 1492-1495, 1995.

GORIN, P. A. J. Rationalization of carbon-13 magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. **Can. J. Chem.**, v. 51, p. 2375-2383, 1973.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v. 142, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts.. **Carbohydr. Res.**, v. 142, p. 253-267, 1985.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In **Handbook of Lichenology**, v. 3, p. 9-24, 1988.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciencia e Cultura** (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science) v.45, p.27-36. 1993.

GREUTER, W. **International Code of Botanical Nomenclature**. Königstein: Koeltz. 1988.

GRUBE, M.; KROKEN, S. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. **Mycol. Res.** v. 11, p. 1284-1294, 2000.

HALE, M. E. **How to know the lichens**. 2<sup>a</sup> ed. Iowa: Brown, 246p., 1979.

HAMADA, N.; MIYAGAWA, H. Secondary metabolites from isolated lichen mycobionts cultured under different osmotic conditions. **Lichenologist (Lond.)**, v. 27, p. 201-205, 1995.



HAMADA, N.; MYIAGAWA, H.; MIYAWAKI, H.; INOUE, M. Lichen substances in mycobionts of crustose lichens cultured on media with extra sucrose. **Bryologist**, v. 99, p. 71-74, 1996.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 357-360, 1965.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. **The lichen forming fungi**. Glasgow: Blackie, 1984.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. Willingford: CAB International, Cambridge University Press. 1995.

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. of Chem. Soc.**, v. 107, p. 8-16, 1915.

HIGUCHI, M.; MIURA, Y.; BOOHENE, J.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I.; YAMADA, Y. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. **Planta Medica**, v. 59, p. 253-255, 1993.

HIRABAYASHI, L.; IEHATA, S.; ITO, M.; SHIGETA, S.; NARUI, T.; SHIBATA, S. Inhibition effect of a lichen polysaccharide sulphate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 2410-2412, 1989.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.

HONEGGER, R.; BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall structure and composition of cultured mycobionts from the lichens *Cladonia macrophylla*, *Cladonia caespiticia*, and *Physcia stellaris* (Lecanorales, Ascomycetes). **Mycological Research**, v. 95, p. 905-914, 1991.

HONEGGER, R. Developmental biology of the lichens. **New Phytologist**, v. 125, p. 659-677, 1993.

HONEGGER, R. Experimental studies with foliose macrolichens: fungal responses to spatial disturbance at the organismic level and to spatial problems at the cellular level during drought stress. **Can. J. of Botany**, v. 73, p. 569-578, 1995.

HONEGGER, R. Mycobionts. In: NASH, T. H. (Ed.). **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 24-36.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. Berlin: Springer Verlag. 1996.

IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C. L.; GORIN, P. A. J. Comparative studies on the polysaccharides of *cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa* and *Cladonia amaurocraea*. **Carbohydr. Res.**, v. 142, n. 2, p. 237-251, 1985.

IACOMINI, M.; ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, L.; GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of  $\beta$ -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.** v. 168, p. 55-65. 1987.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNINGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun. Univ. Stockholm**, v. 8, p. 1-70, 1976.

JENNINGS, H. J.; SMITH, I. C. P. Determination of the composition and sequence of a glucan containing mixed linkages by carbon 13 nuclear magnetic resonance. **J. Am. Chem. Soc.** v. 92, p. 606-608, 1973.

JONES, J. K. N. AND STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 36-38, 1965.

KÖNIG, J.; PEVELÜNG, E. Cell wall of the phycobiont *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia*: constituents and their localization. **Lichenologist**, v. 16, p. 129-144, 1984.

LEAL, J. A.; PRIETO, A.; AHZAREM, O.; PEREYRA, M. T.; BERNABÉ, M. Cell wall polysaccharides: characters for fungal taxonomy and evolution. **Recent Res. Develop in Microbiol.**, v. 5, p. 235-248, 2001.

LEWIS, D. H.; SMITH, D. C. Sugars alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, Physiology and metabolism. **New Phytologist**, v. 66, p. 143-184, 1967.

LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C. A. Studies on the chemistry of lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. **Acta Chem. Scand.**, v. 7, n. 4, p. 591-595, 1953.

LUTZONI, F. M. AND PAGEL, M. Accelerated evolution as a consequence of transitions to mutualism. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 94, p. 11422-11427, 1997.

MATEOS, J. L.; PEDROSA, M.M; MOLINA, M. C.; PEREIRA, C. E.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Involvement of phytochrome-mediated cyclic AMP in the synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on the cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. **Plant Physiol. and Biochem.** v. 31, p. 667-674, 1993.

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Recherches sur l'ámidon. XXXI. La constitution de la lichénine. **Helv. Chim. Acta**, v. 30, n. 3, p. 751-761, 1947.

NISHIKAWA, Y.; MICHISHITA, K.; KURONO, G. Studies on the water soluble constituents of lichens. I. Gas chromatographic analyses of low molecular weight carbohydrates. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 5, p. 1014-1019, 1973.

OSTROFSKY, A.; DENISON, W. Ascospore discharge and germination in *Xanthoria polycarpa*. **Mycologia**, v. 72, p. 1171-1179, 1980.

PEREYRA, M. T.; PRIETO, A.; BERNABÉ, M.; LEAL, J. A. Studies of new polysaccharides from *Lasallia pustulata* (l.) Hoffm. **Lichenologist**, v. 35, n. 2, p. 177-185, 2003.

PORTER, N., FOX, F. M. Diversity of microbial products: Discovery and applications. **Pesticide Science**, v. 39, p. 161-168, 1993.

PRADO-MALUCELLI, S. R. **Análise estrutural de polissacarídeos do líquen *Collema leptosporum* Malme.** Curitiba. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 105p., 1996.

PRADO, S. R. T.; GORIN, P. A. J.; STUELP, P. M.; HONDA, N. K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharides components of *Collema leptosporum*. **Carbohydr. Polymers.** v. 40, p. 271-276. 1999.

PURVIS, W. **Lichens.** Singapore: Craft Print, 2000.

PYATT, F. B. Studies of the periodicity of spore discharge and germination in lichens. **The Bryologist**, v. 72, p. 48-53, 1969.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHEORNS, S. E. **Biologia Vegetal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 206-210.

REIS, R. A. **Caracterização estrutural das glucanas presentes no fungo liquenizado *Teloschistes flavicans* Norman.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

REIS, R. A.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked  $\beta$ -glucan from the lichenized ascomycete *Teloschistes flavicans*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 210, p. 1-5, 2002.

REIS, R. A. **Estudo filogenético de fotobiontes de líquens, Isolamento e cultivo de simbiontes liquênicos, Estudo comparativo de polissacarídeos e ácidos graxos do líquen *Teloschistes flavicans* e seus simbiontes.** Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SAEMAN, J.F., HARRIS, E.E.; KLINE, A.A. Analysis of Wood Sugar. **Ind. Eng. Chem.** v. 17, p. 95, 1954.

SCHLARMANN, G. Cytochemical investigations in cell walls of two ascomycetous mycobionts. In: PEVELING, E. (Ed.) Progress and problems in lichenology in the Eighties. **Biblioteca Lichenologica**, p. 133-135, 1987.

SIPMAN, H. J. M.; APTROOT, A. Where are the missing lichens? MYCOL. RES., v. 105, p. 1433-1439, 2001.

SMITH, A. L. **Lichens**. Cambridge University Press. 1921.

SMITH, D. C. The symbiotic condition. **Symbiosis**, v. 14, p. 3-15, 1992.

SMITH, D. C.; DOUGLAS, A. E. **The Biology of Symbiosis**. London: Edward Arnold. 1987.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental cultivation of lichens and lichen symbionts. **Can. J. Bot.** 73 (suppl.1): P.579-589. Canadá, 1995.

STOKER-WÖRGÖTTER, E. Investigations on the photobiont and resynthesis of the tropical lichen *Coenogonium lepreurii* (Mont.) Nyl. From the north east coast of Brazil in culture symbiosis, v. 23, p. 117-124, 1997.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Culture methods and culture of selected tropical mycobionts and photobionts as exemplified by South American lichens. In: MARCELLI, M. P. AND SEAWARD, M. R. D. (Eds.) **Lichenology in Latin America: History, current knowledge and applications**. São Paulo: CETESB, p. 143-145, 1998.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E. Experimental studies of the lichen symbionts: DNA analysis, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, resynthesis of two- and tripartite symbiosis. **Symbiosis**, v. 30, n. 2, p. 207-227, 2001.

STUELP-CAMPELO, P. M. A.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble  $\alpha$ -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 691-698, 2002.

TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S. Polysaccharides of lichen symbionts. **Chem. Pharm. Bull.** (Japan), v. 27, p. 238-241, 1979.

TEHLER, A. **Systematics, phylogeny and classification.** In: Nash III. T. H. Lichen Biology. Cambridge University Press, p. 217-239, 1996.

TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydr. Res.**, v. 266, n. 2, p. 309-314, 1995.

VICENTE, C. Biochemical and environmental influence on the synthesis and accumulation of lichen phenolics. **Symbiosis**, v. 11, p. 279-297, 1991.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA REDDY, M.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, v. 71, p. 564-566, 2000.

WAKSMAN, N.; DE LEDERKREMER, R. M.; CEREZO, A. S. The structure of an  $\alpha$ -D-glucan from *Cyttaria hariatii* (Fischer). **Carbohydr. Res.** v. 59, p. 505-515, 1977.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p.65-68. 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v.2, p.211-215. 1963b.

WORANOVICZ, S. M.; GORIN, P. A. J.; MARCELLI, M. P.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. **The Lichenologist**, v. 29, n. 5, p. 471-481, 1997.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 51, p. 395-402, 1999.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; AHTI, T.; SASSAKI, G. L.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of lichens of the genus *Cladonia*. **Phytochem.**, v. 52, p. 1069-1074, 1999a.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; PINTO, B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substellata* and

*Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 51, p. 395-402, 1999b.

XAVIER-FILHO, L.; LEITE, J. B. M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana de líquens antárticos. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 63, p. 93-98, 1990.

YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. Tissue cultures of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their cultures. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 3347-3348, 1985.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; HIGUCHI, M.; KINOSHITA, Y.; YOSHIMURA, I. Using lichen tissue cultures in modern biology. **The Bryologist**, v. 96, n. 3, p. 384-393, 1993.

YAMAMOTO, Y.; KINOSHITA, Y.; TAKAHAGI, T.; KROKEN, S.; KUROKAWA, T.; YOSHIMURA, I. Factors affecting discharge and germination of the lichen ascospores. **J. Hattori Bot. Lab.**, v. 85, p. 267-278, 1998.

YOSHIMURA, I.; YAMAMOTO, Y.; NAKANO, T.; FINNIE, J. Isolation and culture of lichens photobionts and mycobionts. In: KRANER, J.; BECKETT, R. P.; VARMA, A. K. (Eds) **Protocols in lichenology: Culturin Biochemistry Ecophysiology and Use in Biomonitoring**. Berlin: Springer Verlag, 2002, p. 15.